

VERGLEICH VON MPN- UND MEMBRAN-TECHNIK
BEIM NACHWEIS VON „FÄKALCOLIFORMEN“
IN MILCH UND MILCHPRODUKTEN

WOLFGANG LILIENTHAL

Diss
München
1905



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554812_0022

Aus dem Institut für Hygiene und Technologie
der Lebensmittel tierischen Ursprungs
(Lehrstuhl: Prof. Dr. G. Terplan)
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München

Vergleich von MPN- und Membran-Technik
beim Nachweis von "Fäkalcoliformen"
in Milch und Milchprodukten

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von

Wolfgang L i l i e n t h a l
aus
Neuburg/Donau

München 1985

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. W. Leidl
Referent: Prof. Dr. G. Terplan
Korreferent: Prof. Dr. K. Walser

Tag der Promotion: 26. Juli 1985

Meiner Mutter und meiner Lebensgefährtin Esther

<u>Inhaltsverzeichnis</u>		Seite
1.	Einleitung	1
2.	Schrifttum	2
2.1	Enterobacteriaceae und Untergruppen der Familie als Marker-Organismen	3
2.1.1	Enterobacteriaceae	3
2.1.2	Coliforme Keime	3
2.1.3	"Fäkalcoliforme" und E. coli	8
2.2	Coliforme und "Fäkalcoliforme als Marker-Keime bei der Untersuchung von Milch und Milchprodukten	12
2.3	Nachweisverfahren für "Fäkalcoliforme" und E. coli	15
3.	Eigene Untersuchungen	25
3.1	Material	25
3.2	Methodik	25
3.2.1	Vorbereitung der Proben	25
3.2.2	Ermittlung der höchstwahrscheinlichen Keimzahl der "Fäkalcoliformen" (Most-Probable-Number-Technik)	26
3.2.3	Ermittlung der kolonienbildenden Einheiten der "Fäkalcoliformen" (Membranverfahren)	29
3.2.4	Herkunft und Zusammensetzung der Nährböden und Reagenzien	31

	Seite
3.3 Ergebnisse	33
3.3.1 Pasteurisierte Konsummilch	34
3.3.2 Säuglings- und Kleinkindernahrung auf Trockenmilchbasis	34
3.3.3 Schnittkäse	34
3.3.3.1 Vergleich von MPN-Technik und Membranverfahren bei Parallelproben von Schnittkäse	38
3.3.4 Weichkäse	42
3.3.4.1 Vergleich zwischen MPN-Technik und Membran- verfahren bei Parallelproben von Weichkäse	47
4. Besprechung der Ergebnisse und Diskussion	52
4.1 Einfluß der Wiederbelebung auf den Nachweis von "Fäkalcoliformen" und Vergleich von MPN-Technik und Membranverfahren	55
4.2 Vergleich zwischen konventionellem und verkürztem MPN-Verfahren	61
4.3 Vorkommen von "Fäkalcoliformen" in den unter- suchten Produkten	68
5. Zusammenfassung/Summary	71
6. Literaturverzeichnis	73

1. Einleitung

Bei der Untersuchung von Milch und Milchprodukten auf ihren technologisch-hygienischen Zustand sowie auf das eventuelle Vorhandensein pathogener Mikroorganismen bedient man sich häufig sogenannter Markerkeime (MOSSEL, 1981), d.h. solcher Mikroorganismen, die entweder Aufschluß über die Produktionshygiene oder über die potentielle Anwesenheit pathogener Spezies geben (INGRAM, 1977). Als wichtigste Marker-Organismen dienen dabei Coliforme, "Fäkalcoliforme" und *E. coli*. Nach zwei umfangreichen Ausbrüchen durch mit enteropathogenen *Escherichia (E.) coli* kontaminierte Weichkäse in den USA und später auch in einigen europäischen Ländern kamen ursprünglich von der kanadischen Gesundheitsbehörde entwickelte Probenpläne und Grenzwerte für die oben genannten Markerkeime in die Diskussion, bei deren Einhaltung man sich die Minimierung der Gefahr einer Belastung von Käse mit pathogenen *E. coli* erhoffte. In diesen Probenplänen finden sich allerdings keine Angaben, mit welchen Untersuchungsverfahren die Einhaltung der Grenzwerte zu prüfen ist. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, an Milch und Milchprodukten die Eignung zwei der zur Zeit empfohlenen Methoden (Most-Probable-Number-Technik und Membran-Agar-Verfahren) für den Nachweis von "Fäkalcoliformen" bzw. *E. coli* Biotyp I zu prüfen.

2. Schrifttum

2.1 Enterobacteriaceae und Untergruppen der Familie als Marker-Organismen

Untersuchungen von Lebensmitteln und Trinkwasser auf ihren Gesamtgehalt an Enterobacteriaceae, auf Coliforme, "Fäkal-coliforme", präsuntive *E. coli*, *E. coli* Biotyp I usw. dienen in der Regel dazu, entweder einen Überblick über die bei der Produktion hinsichtlich der Hygiene aufgewendete Sorgfalt ("Good Manufacturing Practice") oder über die mögliche Anwesenheit pathogener Mikroorganismen zu erhalten. Obwohl derartige Untersuchungen bereits gegen Ende des letzten Jahrhunderts durchgeführt wurden (nach BORNEFF (1957) seit 1888 durch MACE), erfolgte eine Trennung dieser beiden verschiedenen Zielrichtungen erst 1977 durch INGRAM. Demnach soll zwischen Indikator- und Index-Mikroorganismen, zusammengefaßt als Marker-Organismen (MOSSEL, 1981), unterschieden werden. Entsprechend der Definition weist die Anwesenheit von Indikator-Organismen in Lebensmitteln, die im Hinblick auf Haltbarkeit und Sicherheit erhitzt oder sonstwie dekontaminiert worden sind, in Mengen, die vorgeschriebene Grenzwerte pro Gramm überschreiten, nur auf eine unzureichende Behandlung (zu niedrige Letalität bzw. nachträgliche Rekontamination) hin. Die Anwesenheit oder Abwesenheit von pathogenen Keimen ist in diesem Zusammenhang irrelevant. Im Gegensatz dazu verfolgt die Prüfung von Lebensmitteln oder Wasser auf das Vorhandensein von Index-Mikroorganismen die Feststellung der Möglichkeit, daß diese Materialien auch mit pathogenen Mikroorganismen belastet sein können (MOSSEL et al., 1978). Ein Marker-Organismus kann in ein und demselben Lebensmittel sowohl Index- als auch Indikator-Funktion haben. So weisen beispielsweise hohe Zahlen an *Escherichia coli* in gekochten und geschälten Krabben ("processed for safety") sowohl auf einen unzumutbaren bakteriologischen Status, bedingt durch unzureichende Erhitzung und/oder Rekontamination hin, als auch auf die Möglichkeit einer Kontamination mit pathogenen Keimen, die am Herstellungsort präsent sein können (MOSSEL, 1981).

Die wichtigsten und bis heute einzigen Marker-Organismen, auf die in großem Umfang bei der Lebensmittel- und Trinkwasseruntersuchung zurückgegriffen wird, sind Gruppen innerhalb der Familie der Enterobacteriaceae, die im folgenden besprochen werden sollen.

2.1.1 Enterobacteriaceae

Zur Familie der Enterobacteriaceae (siehe Tab. 1) gehören gramnegative, aerob oder fakultativ anaerob wachsende, nicht sporenbildende Stäbchen, die unbeweglich oder mittels peritricher Begeißelung beweglich sind, mit wenigen Ausnahmen Nitrat zu Nitrit reduzieren, Glukose unter Säure- oder Säure- und Gasbildung spalten und eine negative Oxidasereaktion zeigen (EDWARDS und EWING, 1972; BRENNER, 1984). Die wichtigsten systematischen Einteilungen finden sich bei KAUFFMANN (1966), EDWARDS und EWING (1972) und BRENNER (1984). Zwischen den Systemen dieser Autoren bestehen zum Teil beträchtliche Unterschiede, auf die hier nicht näher eingegangen werden soll. In Abb. 1 sind entsprechend ihrer DNA-Verwandtschaft die nach der 9. Auflage von Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (BRENNER, 1984) zu den Enterobacteriaceae gehörenden Genera zusammengefaßt. Inzwischen liegt allerdings eine Arbeit neueren Datums von der amerikanischen Gesundheitsbehörde (Centers for Disease Control) vor (FARMER et al., 1985), in der insgesamt 22 Genera, 69 Species und 29 Biotypen den Enterobacteriaceae zugeordnet werden.

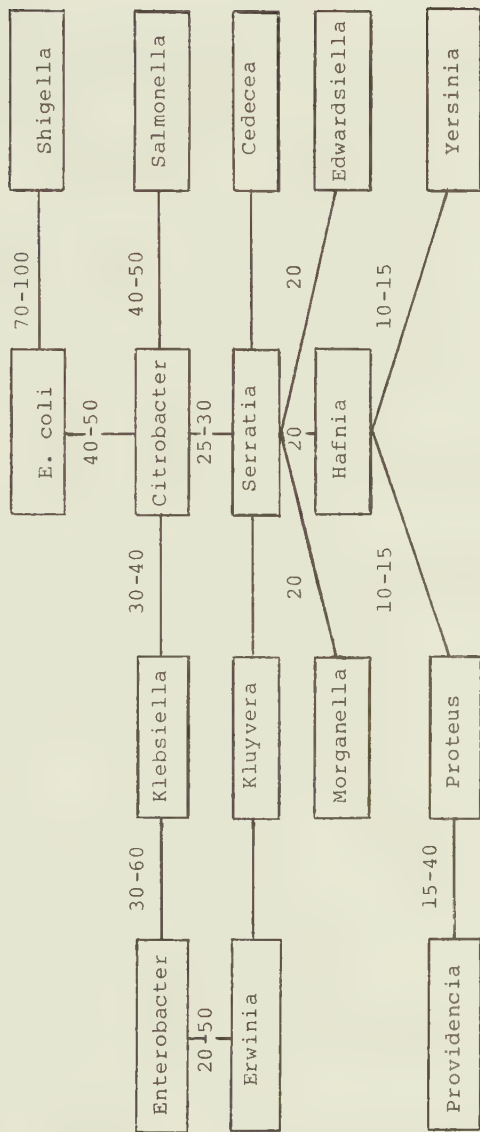
2.1.2 Coliforme Keime

Der Begriff Coliforme Keime (siehe Tab. 1) bezeichnet keine taxonomisch begründete Einheit von Bakterien (siehe hierzu WEISS und BUSSE, 1968), sondern umfaßt ursprünglich alle laktosefermentierenden, aerob wachsenden Bakterien, die als Maßstab für eine Verunreinigung des Wassers dienen (BREED und NORTON, 1937). In der 14. Aufl. der Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA et al., 1976) werden

Tabelle 1: Enterobacteriaceae - Definitionen und Untergruppen

Definitionen	Bezeichnung
Gramnegative Stäbchen, die Glukose abbauen und negative Oxidase-Reaktion zeigen	Enterobacteriaceae
Enterobacteriaceae, die bei 30-37 °C Laktose unter Gas- und/oder Säurebildung abbauen	Coliforme
Coliforme, die bei 44,5 °C Gas bilden	"Fäkalcoliforme"
Coliforme, die bei 44 °C Gas und Indol bilden	ICMSF (europ.): "Fäkalcoliforme" ISO: präsumtive E. coli
Coliforme, die im IMVEC-Test typisch reagieren (++++, -+--, +---, ----)	E. coli

Abbildung 1: DNA-Verwandtschaft zwischen Enterobacteriaceae. Die Zahlen repräsentieren den ungefähren Verwandtschaftsgrad in Prozent (BRENNER, 1984)



die Coliformen definiert als aerob oder fakultativ anaerob wachsende, gramnegative, stäbchenförmige Bakterien, die Laktose bei 35 °C innerhalb 48 h unter Gasbildung fermentieren. Bei Verwendung fester Nährböden (Endo-Agar) weicht die Beschreibung hiervon etwas ab. Mit Ausnahme der Bebrütungstemperatur (32 °C statt 35 °C) ist die Definition in den Standard Methods for the Examination of Dairy Products (APHA, 1972) mit der oben angeführten identisch. Allerdings wird darauf hingewiesen, daß sowohl Bakterien fäkalen als auch nicht fäkalen Ursprungs, sowie einige wenige Laktose-spaltende Keime, die nicht zu den Enterobacteriaceae gehören, mit erfaßt werden. Hierbei handelt es sich in erster Linie um Laktose-positive Vertreter der zu den Vibrionaceae gehörenden Gattung *Aeromonas* (GRABOW et al., 1981). Um diese Wasserkeime von den eigentlichen Coliformen abgrenzen zu können, müssen die Isolate dem Cytochromoxidase-Test unterzogen werden, wie es z.B. in der Bundesrepublik die Trinkwasser-Verordnung vom 31. Jan. 1975 in Anlage 2 vorschreibt. Andere beim Test auf Coliforme gefundene nicht-Enterobacteriaceae scheinen ebenfalls standortspezifisch zu sein. So fanden AUSTIN et al. (1981) in Austern, nicht aber in Wasserproben *Acinetobacter calcoaceticus* und *Chromobacterium violaceum*.

ICMSF (1978) betrachtet als Coliforme *E. coli* und andere Enterobacteriaceae-Gattungen (*Citrobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter*), weist aber auf die Methodenabhängigkeit des zu erwartenden Keimspektrums hin. Letzteres wird auch im Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods (APHA, 1976) hervorgehoben. Im übrigen unterscheidet sich die Definition hier nicht von der bei APHA et al. (1976), abgesehen von der Angabe zur Bebrütungstemperatur, die mit 32 - 37 °C angegeben wird.

Der Begriff Coliforme geht nach Angaben von THOMAS (1955) und MOSSEL (1967) auf BLACHSTEIN (1893), SCHARDINGER (1894) und REVIS (1910) zurück und wurde in den dreißiger Jahren in den USA für die Trinkwasseruntersuchung übernommen (BREED und NORTON, 1937). In Deutschland war, ebenso wie in England (THOMAS, 1955), lange Zeit der Begriff der Coli-Aerogenes-

Gruppe in Gebrauch, der in der Bundesrepublik erst in den fünfziger Jahren durch den der Coliformen verdrängt wurde (SEELEMANN und WEGENER, 1956). Allgemein werden im Schrifttum beide Termini synonym gebraucht, bzw. findet sich nur noch die Bezeichnung Coliforme, soweit es sich um neuere Literatur handelt. Davon abweichend definieren HARRIGAN und McCANCE (1976) Coliforme als solche Enterobacteriaceae, die bei 35-37 °C und die Coli-aerogenes-Gruppe als solche, die bei 30 °C Laktose-positiv sind.

Das Konzept, Trinkwasser auf einen Marker-Organismus statt auf den zur damaligen Zeit nur schwer zu isolierenden Typhuserreger (SCHARDINGER, 1892) zu prüfen, geht ursprünglich auf MACÉ (1888) und SCHARDINGER (1892) zurück (BORNEFF, 1957; MOSSEL, 1967). Derartige Untersuchungen erschienen sinnvoll, da man annahm, der damals als "Bacterium coli commune" bezeichnete Marker-Keim sei eng an das menschliche Darmmilieu gebunden und sein Vorkommen in Wasser deute daher stets auf eine fäkale Verunreinigung hin. Damit besteht aber auch die Gefahr, daß mit den Fäzes möglicherweise Salmonella typhi in das Wasser gelangt ist. Bereits kurze Zeit später wurde klar, daß der Begriff des "Bacterium coli commune" sehr weit gefaßt war und "Colikeime" im Boden, an Pflanzen, in Lebensmitteln und auch in Wasserproben zu finden sind, obwohl zumindest keine frische fäkale Verunreinigung vorliegt (SELENKA, 1967). In der Folgezeit versuchte man diese Coliformen nicht fäkalen Ursprungs von solchen, bei denen der Verdacht naheliegt, daß sie aus dem Darm von Warmblütern stammen könnten, abzugrenzen. Dies führte zur Erstellung eines auf dem IMViC-Schema (Indol-Bildung, Methylrot- und Voges-Proskauer-Reaktion, Citratverwertung) (RUCHHOFFT et al., 1931; PARR, 1936), unter Einschluß der von EIJKMAN (1904) beschriebenen "Gärungsprobe" bei erhöhten Bebrütungstemperaturen (ursprünglich Gasbildung aus Glukose bei 46 °C, später aus Laktose bei etwas geringeren Temperaturen, z.B. 44 °C) beruhenden Testsystems. Die später im Schrifttum zu findende Abkürzung IMVEC-Schema (E = EIJKMAN-Test) berücksichtigt dies (MUSHIN und ASHBURNER, 1961).

Mit Hilfe des Schemas ließen sich die bei der Untersuchung auf Coliforme, die sich inzwischen auf den Milchsektor und etwas später auch auf andere Lebensmittel ausgedehnt hatte (Literatur siehe MOSSEL, 1967), erfaßten Mikroorganismen je nach ihrer IMVEC-Formel in Gruppen einteilen. Häufig verwendete derartige Klassifizierungen sind in Tab. 2, die dem Report of the Coli-aerogenes (1956) Sub-Committee of the Society for Applied Bacteriology entnommen wurde (REPORT, 1956) einander gegenübergestellt. Wie aus der Tab. hervorgeht, wurde in der jüngsten Einteilung (letzte Spalte, Coli-aerogenes (1956) Sub-Committee) bereits zwischen "scientific names" für taxonomische und "descriptive names" für praktische Zwecke differenziert. Das 1978 bei der International Commission on Microbiological Specifications for Foods aufgeführte Differenzierungsschema auf der Basis des IMVEC-Testes findet sich in Tab. 3. Es sei allerdings darauf hingewiesen, daß derartige Analysen in der Routineuntersuchung regelmäßig nicht vorgesehen sind (ICMSF, 1978) und heute für wissenschaftliche Arbeiten bessere bzw. aufgrund der erheblich erweiterten Systematik (BRENNER, 1984) auch umfangreichere Untersuchungskriterien herangezogen werden müssen (zur Kritik an der Brauchbarkeit der im IMVEC-Test geprüften Reaktionen siehe z.B. BORNEFF, 1957 und SELENKA, 1967).

2.1.3 "Fäkalcoliforme" und E. coli

Da bei der Trinkwasseruntersuchung auf Coliforme Keime die Erkennung fäkaler Verunreinigungen im Mittelpunkt steht, ergibt sich die Frage, welche der in den Tab. 2 und 3 aufgeführten Keime tatsächlich aus dem Darm von Warmblütern stammen. Die meisten Untersuchungen gehen davon aus, daß es sich hierbei, unter dem Aspekt der Regelmäßigkeit betrachtet, nur um E. coli handeln kann (z.B. ICMSF, 1978). SELENKA (1967) hat in diesem Zusammenhang eine Auswertung der Literatur vorgenommen und kommt zu folgenden Ergebnissen: E. coli repräsentierte ca. 95 % der aus frischen menschlichen

Tabelle 2: Beziehungen zwischen verschiedenen Schemata zur Klassifizierung coliformer Keime (aus: REPORT, 1956)

Coliform Sub-Committee (1949)		Reactions				Wilson <i>et al.</i> (1935) name	Coli-aerogenes (1956) Sub-Committee		
Name	Group	In- dole	MR	V-P	Cit- rate	44° Gel- atin	Scientific name	Descriptive name	Abbreviation
<i>Bacterium coli</i> type I	Ia	+	+	-	-	+	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i> (indole-positive, 44° positive)	<i>E. coli</i> I
<i>Bacterium coli</i> type I 44° negative	Ib	+	+	-	-	-	Irregular I coli-like I	<i>Escherichia coli</i> (indole-positive, (44° negative)	<i>E. coli</i> III
<i>Bacterium coli</i> type II	IIa	-	+	-	-	-	<i>Bacterium coli</i> type II	<i>Escherichia coli</i> (indole-negative)	<i>E. coli</i> II
Intermediate type I	IIIa	-	+	-	+	-	Intermediate type I	<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Cit. freundii</i> I
Intermediate type II	IVa	+	+	-	+	-	Intermediate type II	<i>Citrobacter freundii</i> (indole-positive)	<i>Cit. freundii</i> II
<i>Bacterium aerogenes</i> type I	Va	-	-	+	+	-	<i>Bacterium aerogenes</i> type I	<i>Klebsiella aerogenes</i>	<i>K. aerogenes</i> I
<i>Bacterium cloacae</i>	Vb	-	-	+	+	+	<i>Bacterium cloacae</i>	<i>Klebsiella cloacae</i>	<i>K. cloacae</i>
<i>Bacterium carotovorum</i> *	Vc	-	-	+	+	+	<i>Erwinia carotovora</i>	<i>Klebsiella aerogenes</i> (indole-positive)	<i>Erv. carotovora</i>
<i>Bacterium aerogenes</i> type II	VIa	+	-	+	+	-	<i>Bacterium aerogenes</i> type II	<i>Klebsiella aerogenes</i> (indole-positive)	<i>K. aerogenes</i> II

* Characterized by pectin liquefaction.
 Cannot be named without further investigation; at present should be described by use of suffixes

Tabelle 3: Differenzierung von Coliformen (aus ICMSF, 1978)
(alle aufgeführten Keime sind in der Lage, innerhalb von
48 h bei 35-37 °C Säure und Gas aus Laktose zu bilden)

	Gas in Laktose- Gallensalz- Medium bei 44-45,4 °C	Indol- Test	Methyl- rot- Test	Voges- Proskauer- Test	Wachstum in Citrat
<i>Escherichia coli</i>					
Typ I (typisch)	+	+	+	-	-
Typ II	-	-	+	-	-
Intermediate					
Typ I	-	-	+	-*	+
Typ II	-	+	+	-*	+
<i>Enterobacter**aerogenes</i>					
Typ I	-	-	-	+	+
Typ II	-	+	-	+	+
<i>Enterobacter cloacae</i>	-	-	-	+	+
<i>Irregularis</i>					
Typ I	-	+	+	-	-
Typ II	+	-	+	-	-
<i>Irregularis</i> , andere Typen				Reaktionen variabel	

* schwach positive Reaktionen werden gelegentlich gefunden

**die Judicial Commission of the International Committee on Nomenclature of
Bacteria of IAMS hat offiziell den Terminus *Enterobacter* als Gattungsbezeichnung
für das früher als *Aerobacter* bekannte Genus eingesetzt (*Enterobacteriaceae*
Subcommittee, 1963).

Fäzes zu isolierenden laktosevergärenden Organismen. Davon waren mehr als 90 % aller Stämme dem *E. coli* Typ I zuzurechnen, *E. coli* Typ II machte maximal 0,8 %, *Irregularis* I und *Irregularis* II maximal 2,4 bzw. 4,8 % aus. In tierischen Fäzes lag der Anteil des Typ I sogar noch höher. Die in Tab. 3 genannten Intermediate- und Enterobacter-Keime konnten in 3-5 %, einmal auch in 9 % der menschlichen Stuhlproben nachgewiesen werden. In tierischen Fäzes lagen die Werte in der Regel noch niedriger bzw. waren diese Keime nicht nachweisbar. Den überwiegenden Anteil derartiger Darmkeime macht somit *E. coli* aus, auch wenn BAGLEY und SEIDLER (1977) daraufhinwiesen, daß bestimmte *Klebsiella*-Varianten (IMVIC (+)-++) bei 30-40 % aller Menschen und Tiere im Darm angetroffen werden sollen. Auf die beim "Fäkalcoliformen"-Test positiv reagierenden *Klebsiellen* (BAGLEY und SEIDLER, 1977; AUSTIN et al., 1981; GRABOW et al., 1981) wird später noch näher eingegangen. Innerhalb der Spezies *E. coli* werden, wie aus Tab. 2 hervorgeht, drei "Typen" unterschieden, nämlich zwei Indol-positive, die entweder bei 44 °C Gas bilden (Typ I) oder nicht (Typ III oder *Irregularis* I) und ein Indol-negativer (Typ II) der meist bei 44 °C nicht aktiv ist (Typ II: nach CLARK et al. (1958) in ca. 80 % der Fälle Gas/44 °C negativ). Über eine relativ enge Beziehung von *E. coli* Typ I zu Fäzes herrscht Übereinstimmung, wenn auch MOSSEL (1982) daraufhinweist, daß Überleben oder sogar Vermehrung in geeigneten ökologischen Nischen möglich ist. Über die Bedeutung der anderen, im "Fäkalcoliformen"-Test (d.h. Abgrenzung der Keime fäkalen von solchen nicht fäkalen Ursprungs mittels erhöhter Bebrütungstemperatur, siehe Tab. 1) erfaßten Keimgruppen haben sich dagegen zwei unterschiedliche Anschauungen, eine "nord-amerikanische" und eine "europäische" herauskristallisiert (ICMSF, 1978). Während man in den USA dazu tendiert, nicht nur das Vorkommen von *E. coli* sondern auch dasjenige von Coliformen, deren fäkale Herkunft nicht mit letzter Sicherheit ausgeschlossen werden kann, als Anzeiger für eine Verunreinigung mit Darminhalt anzusehen (eine Zusammenfassung der amerikanischen Einschätzung von Coliformen und

"Fäkalcoliformen" als Indikatoren für Trinkwasser-kontamination findet sich bei KABLER und CLARK (1960)), beschränkt man in Europa dagegen die möglichen Marker-Keime auf *E. coli*, meist sogar nur auf Typ I. Als Gründe hierfür nennt SELENKA (1967) vor allem das seltene Vorkommen der übrigen biochemischen Typen und Coliformen in Fäzes sowie ihre verlängerte Überlebens- bzw. Vermehrungsfähigkeit außerhalb des Darmes. Dementsprechend versuchten auch MACKENZIE et al. (1948) die Irregularis-Typen II und VI, die wie *E. coli* Typ I bei 44 °C Laktose unter Gasbildung abbauen können, durch Einschluß der Indolprobe zu eliminieren (MTG-Test) und so letztlich zum alleinigen Nachweis von *E. coli* Typ I zu kommen.

2.2 Coliforme und "Fäkalcoliforme" als Marker-Keime bei der Untersuchung von Milch und Milchprodukten

Die Untersuchung von pasteurisierter Milch auf Coliforme wird etwa seit 1920 durchgeführt (McCRADY und LANGEVIN, 1932). Da es als gesichert gilt, daß Enterobacteriaceae die bei den Erhitzungsverfahren eingesetzten Temperaturen in der Regel nicht überleben (BUCHBINDER und ALFF, 1947), ist davon auszugehen, daß jede Belastung mit diesen Keimen auf eine Re-kontamination zurückzuführen ist. Der Nachweis der Coliformen in pasteurisierter Milch kann daher als Indikator für die Effizienz der betriebshygienischen Maßnahmen, die nach dem Erhitzer einwirken, herangezogen werden (McCRADY und LANGEVIN, 1932).

Tab. 4 gibt einen Überblick über die in Milch und Milchprodukten zu erwartenden, Milchzucker spaltenden Enterobacteriaceae. Neben den früher als Coliforme im engeren Sinne bekannten Gattungen *Escherichia*, *Citrobacter*, *Klebsiella* und *Enterobacter* wurden in neueren Untersuchungen auch andere Genera, z.T. auch solche, die normalerweise als Laktose-negativ gelten, in Milch und Milchprodukten gefunden.

Seit es im Jahre 1971 in den USA (MARIER et al., 1973) und 1983 in einigen europäischen Ländern zu umfangreichen

Tabelle 4: Biochemisches Verhalten von einigen milchwirtschaftlich relevanten Coliformen¹⁾

- 13 -

Genus	Spezies	Laktose 37 °C 44-45,5 °C		Indol 37 °C	Methylrot 37 °C	Voges-Proskauer 37 °C	Citrat 37 °C
Escherichia*	coli (inaktiv)	+	+	+	+	-	-
		[-]	-	[+]	+	-	-
Citrobacter*	diversus freundii	d d	? [-]	+	+	-	+
				-	+	-	+
Klebsiella*	pneumoniae sp. pneumoniae oxytoca	+	d	-	[-]	+	+
		+	-	+	d	+	+
Enterobacter*	cloacae sakazakii agglomerans aerogenes	+	-	-	-	+	+
		+	?	[-]	[-]	+	+
		d	?	[-]	d	d	d
		+	-	-	-	+	+
Kluyvera	ascorbata cryocrescens	+	?	[+]	+	-	+
		+	?	[+]	+	-	[+]
Serratia	liquefaciens	-2)	-	-	[+]	[+]	+
Hafnia	alvei	-3)	?	-	d	d	-

* Coliforme im engeren Sinne

+: 90-100 % der Stämme positiv; [-]: 76-89 % der Stämme positiv; d: 26-75 % der Stämme positiv; [-]: 11-25 % der Stämme positiv; -: 0-10 % der Stämme positiv

1) Angaben nach: BERGEY'S manual, 9. Aufl. (1984); AUSTIN et al. (1981); ICMSF (1978); STENZEL et al. (1972)

2) Nach KLEEBCER et al. (1980) und GRIEM (1982) bis zu ca. 50 % der Stämme positiv

3) Nach KLEEBCER et al. (1980) 84 % der Stämme positiv

Erkrankungen durch hohe Zahlen an enteropathogenen *E. coli* in Weichkäsen kam, wurde versucht, durch den Nachweis der Coliformen bzw. "Fäkalcoliformen" das Risiko einer möglichen Belastung mit pathogenen Enterobacteriaceae abzuschätzen. Dies führte in Kanada zu der Erstellung eines Standards für die bakteriologische Untersuchung von Käse, der eine Limitierung der Gehalte an diesen Keimen vorsieht (COLLINS-THOMPSON et al., 1977). An diesem mehr auf die mögliche Index-Funktion der Coliformen bzw. "Fäkalcoliformen" Gewicht legenden Konzept wurden erhebliche Zweifel laut, die sich im Wesentlichen wie folgt zusammenfassen lassen:

1. Coliforme können zwar, wie oben ausgeführt, Rückschlüsse auf die Effektivität bestimmter betriebshygienischer Maßnahmen zulassen, also im Sinne von Indikatorkeimen fungieren, ihnen eine Indexfunktion für eine fäkale Verunreinigung und damit eine mögliche Kontamination mit pathogenen Darmkeimen zuzuschreiben, erscheint dagegen bei Lebensmitteln, speziell Milch und Milchprodukten fragwürdig. Wie Untersuchungen gezeigt haben, gehören die Coliformen zu den häufigen Vertretern der Mikroflora milchwirtschaftlicher Betriebe und können sich sowohl in den Anlagen als auch den Produkten halten und evtl. vermehren, wie z.B. von PARK et al. (1973), FANTASIA et al. (1975), FRANK et al. (1977; 1978), MOURGUES et al. (1977), TOLLE et al. (1980; 1981) und GRIEM (1982) für Coliforme und auch speziell *E. coli* in Käse nachgewiesen wurde.

2. Sowohl unter technologischen als auch hygienischen Aspekten ist es sinnvoll, den Gehalt an Coliformen möglichst niedrig zu halten. Eine Sicherheit hinsichtlich der Belastung des Produktes mit enteropathogenen *E. coli* ist aus niedrigen Coliformenzahlen allerdings nicht unbedingt abzuleiten. So wurden bei dem oben erwähnten Ausbruch in den USA (MARIER et al., 1973) Käseproben im Verlauf der Reifung auf ihren Gehalt an Coliformen geprüft, wobei sich nur $10^2 - 10^3$ /g fanden. Im fertigen Produkt lagen die Werte bei $10^3 - 10^5$, für den enteropathogenen *E. coli*-Stamm bei $10^5 - 10^7$ /g. Da es sich

hierbei um eine Laktose nur verzögert abbauende Variante handelte, ist die Ursache für diese Differenz in der Nachweisttechnik, die gewöhnlich auf der Sichtbarmachung der Milchzuckerspaltung über pH-Wert-Verschiebungen oder Gasbildung beruht, zurückzuführen.

3. Wenig geeignet erscheint in diesem Zusammenhang auch die Bebrütung bei erhöhten Temperaturen, wie sie der Nachweis der "Fäkalcoliformen" vorsieht. Nach Untersuchungen von MEHLMAN und ROMERO (1982) und FRANKE (1982) kann bei solchen Temperaturen ein gewisser Prozentsatz der enteropathogenen *E. coli* gehemmt werden.

2.3 Nachweisverfahren für "Fäkalcoliforme" bzw. *E. coli*

Zur Isolierung von "Fäkalcoliformen" bzw. *E. coli* werden verschiedene Verfahren beschrieben, die sich in solche mit festen (Nachweis der Säurebildung aus Laktose oder der Indolbildung) und solche mit flüssigen Medien (Nachweis der Gasbildung aus Laktose und/oder der Indolbildung) unterteilen lassen. In Tab. 5 und 6 sind die wichtigsten hierzu empfohlenen Methoden zusammengefaßt.

Im Schrifttum wird bei den Tests auf "Fäkalcoliforme" und *E. coli* in der Regel mehr Gewicht auf den Ausschluß falsch-positiver als auf den falsch-negativer Ergebnisse gelegt. Das Vorkommen beider Fehlresultate wird wesentlich von der Bebrütungstemperatur und -dauer bestimmt (FISHBEIN, 1962). Die Beziehungen sind in Tab. 7 dargestellt.

Für das Vorkommen falsch-negativer Ergebnisse können sowohl Eigenschaften der Keime selbst als auch methodische Fehler bei der Untersuchung verantwortlich sein. So schwanken zwar die Angaben verschiedener Untersucher zur Häufigkeit Laktose nicht oder nicht unter Gasbildung spaltender *E. coli*-Stämme, doch ist den Angaben von EDWARDS und EWING (1972) zu entnehmen, daß

Tabelle 5: Nachweis von "Fäkalcoliformen" bzw. E. coli mit festen Nährböden

Verfahren nach KLEIN und FUNG (1976):

1. Beimpfung eines festen Selektivmediums (Kristallviolett-Neutralrot-Galle-Laktose-Agar).
Bebrütung: 24 h/44,5 $\pm$ 0,5 °C
2. Zählung typischer Kolonien (purpurrot, Durchmesser mehr als 0,5 mm)
3. Bestimmung der Anzahl "Fäkalcoliformer" (Definition: Bakterien, die nach diesem Verfahren Laktose bei 44,5 °C unter Säurebildung abbauen)

Verfahren nach ANDERSON und BAIRD-PARKER (1975) in der Modifikation von HOLBROOK, ANDERSON und BAIRD-PARKER (1980):

1. Auflegen einer Zellulose-Acetat-Membran auf die gut vorgetrocknete Oberfläche von modifiziertem Glutaminat-Agar oder Nähragar und Beimpfung.
Bebrütung: 4 h/37 °C (Resuscitation)
2. Vorsichtiges Entfernen der Membran vom nicht-selektiven Agar und Auflegen auf die vorgetrocknete Oberfläche von Caseinpepton-Galle-Agar.
Bebrütung: 18 h/44 °C $\pm$ 0,5 °C
3. Vorsichtiges Entfernen der Membran vom Selektivagar und Färbung der Kolonien auf der Membran mittels Indol-Reagenz
4. Zählung der Indol-positiven Kolonien
5. Bestimmung des E. coli Biotyp I-Gehaltes (Definition: Bakterien, die nach diesem Verfahren bei 44 °C Indol bilden)

Tabelle 6: Nachweis von "Fäkalcoliformen" bzw. E. coli
mit flüssigen Nährböden

Verfahren nach ICMSF (1978):

1. Nordamerikanische Methode
 - 1.1 Beimpfung eines flüssigen, selektiven Anreicherungsmediums (Laurylsulfat-Tryptose-Bouillon) im MPN-Verfahren
Bebrütung: 24 und 48 h/37 °C
 - 1.2 Aus positiven Röhrchen (Gasbildung) Beimpfung eines flüssigen Selektivmediums (EC-Bouillon)
Bebrütung: 24 und 48 h/44,5 ± 0,2 °C
 - 1.3 Ermittlung der Anzahl der Röhrchen mit Gasbildung pro Verdünnungsstufe
 - 1.4 Bildung der Indexziffer und Bestimmung der höchstwahrscheinlichen Keimzahl an "Fäkalcoliformen" (Definition: Bakterien, die bei Durchführung der in dieser Empfehlung festgelegten Methode bei 44,5 °C Laktose unter Gasbildung abbauen)
2. Europäische Methode
 - 2.1 Beimpfung eines flüssigen, selektiven Anreicherungsmediums (MacConkey-Bouillon) im MPN-Verfahren
Bebrütung: 24 und 48 h/35-37 °C
 - 2.2 Aus positiven Röhrchen (Gasbildung) Beimpfung eines flüssigen Selektivmediums (Brillantgrün-Galle-Laktose-Bouillon 2 %)
Bebrütung: 24 und 48 h/44 ± 0,1 °C
 - 2.3 Aus positiven Röhrchen (Gasbildung) Beimpfung von Pepton-Wasser
Bebrütung: 24 h/44 ± 0,1 °C
Prüfung auf Indolbildung
 - 2.4 Ermittlung der Anzahl der Röhrchen mit Gas- und Indolbildung pro Verdünnungsstufe
 - 2.5 Bildung der Indexziffer und Bestimmung der höchstwahrscheinlichen Keimzahl an "Fäkalcoliformen" (Definition: Bakterien, die bei Durchführung der in dieser Empfehlung festgelegten Methode bei 44 °C Laktose unter Gasbildung abbauen und Indol bilden)

Fortsetzung Tab. 6:

Verfahren nach APHA (1976):

Wie Verfahren nach ICMSF (1978); 1. Nordamerikanische Methode, außer:

- a) Bebrütung unter 1.1 bis 48 ± 2 h/35,5 °C
- b) Bebrütung unter 1.2 24 ± 2 h

Verfahren nach ISO/DIS 7251 (1983):

- 1. Beimpfung eines flüssigen Anreicherungsmediums (Laurylsulfat-Tryptose-Bouillon) in Form der MPN-Technik
Bebrütung: 24 bis 48 h/35 °C oder 37 °C
- 2. Aus positiven Röhrchen (Anreicherungsmedium) Beimpfung eines flüssigen Selektivmediums (EC-Bouillon)
Bebrütung: 24 bis 48 h/45 ± 1 °C
- 3. Aus positiven Röhrchen (Selektivmedium) Beimpfung von Trypton-Wasser
Bebrütung: 48 h/45 ± 1 °C
Prüfung auf Indolbildung
- 4. Ermittlung der Anzahl Indol-positiver Röhrchen pro Verdünnungsstufe
- 5. Bildung der Indexziffer und Bestimmung der MPN präsumtiver Escherichia coli (Definition: Bakterien, die bei Durchführung der in diesem Standard festgelegten Verfahren bei 45 °C sowohl Laktose unter Gasbildung vergären als auch Indol bilden)

Verfahren nach AOAC (1980):

- 1. Beimpfung eines flüssigen, selektiven Anreicherungsmediums (Laurylsulfat-Tryptose-Bouillon) im MPN-Verfahren
Bebrütung: 48 ± 2 h/35 °C
- 2. Aus positiven Röhrchen (Gasbildung) Beimpfung eines flüssigen Selektivmediums (EC-Bouillon)
Bebrütung: 48 ± 2 h/45,5 $\pm 0,05$ °C

Fortsetzung Tab. 6:

3. Aus Gas-positiven Röhrchen Ausstreichen auf Eosin-Methylenblau-Laktose-Agar nach LEVINE
Bebrütung: 18 bis 24 h/35 °C
4. Ausstreichen von zwei oder mehr typischen Kolonien auf PC-Agar
Bebrütung: 18 bis 24 h/35 °C
5. Bestätigung typischer Kolonien mit IMViC-Test, Gasbildung in Laurylsulfat-Tryptose-Bouillon und Gramfärbung
6. Bildung der Indexziffer und Bestimmung der höchstwahrscheinlichen Keimzahl an *Escherichia coli*
(Definition: Gramnegative, nicht sporenbildende Stäbchen, die Gas aus Laktose bilden und im IMViC-Schema die Reaktionen ++-- oder -+- zeigen)

Tabelle 7: Einfluß von Bebrütungstemperatur und -dauer* auf die Erfassung von *E. coli* bei der Bestimmung von "Fäkalcoliformen"

1. Mit Erhöhung der Temperatur (44-46 °C) steigt der Anteil der falsch-negativen und sinkt der Anteil der falsch-positiven Resultate.
- 2 Mit Verlängerung der Dauer (24-48 h) steigt einerseits der Anteil der *E. coli*-Isolate, andererseits nimmt der Anteil falsch-positiver Ergebnisse erheblich zu.

* außerdem sind andere Faktoren (wie Medium, Art des Lebensmittels) von Bedeutung

nur 89,6 % von 1021 zufällig ausgewählten E. coli-Stämmen Laktose innerhalb von ein bis zwei Tagen abbauten. Die Fähigkeit zur Indolbildung scheint demgegenüber ein bedeutend stabileres Merkmal zu sein. So waren von den erwähnten 1021 Kulturen 99,2 % Indol-positiv. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch andere Untersucher: HENRIKSEN (1954b) stellte bei 95,8 % bzw. 97,1 %, THOMAS et al., (1955) bei 93,4 %, MATSEN und SHERRIS (1969) bei 93,9 %, ISENBERG und PAINTER (1971) bei 99,8 %, TRAUB et al. (1977) bei 97,7 % und GRABOW et al. (1981) bei 99,7 % aller E. coli-Stämme Indolbildung fest. Die Tatsache, daß der Prozentsatz Indol-positiver E. coli-Stämme höher liegt als der Laktose unter Gasbildung abbauender sowie die Zeitaufwendigkeit der Tests mit flüssigen Nährböden (siehe Tab. 6) und die geringere Genauigkeit der MPN-Technik in höheren Keimzahlbereichen veranlaßten ANDERSON und BAIRD-PARKER (1975) zur Weiterentwicklung eines auf DELANEY et al. (1962) zurückgehenden Membran-Agar-Verfahrens, welches nur die Indolbildung bei 44 °C als Kriterium für E. coli heranzieht und schon nach 24 Stunden auswertbar ist. In der ursprünglichen Version (ANDERSON und BAIRD-PARKER, 1975) wurde das verdünnte Probenmaterial auf den mit einer Zellulose-Acetat-Membran belegten Trypton-Galle-Agar (TBA) verbracht und gleichmäßig über die Membran verteilt. Nach 18-24 stündiger Bebrütung bei 44 °C werden diejenigen Membranen, auf denen Kolonien gewachsen sind, vom TBA abgehoben und in 1-2 ml Indol-Reagenz nach VRACKO und SHERRIS (1963) eingelegt. Indol-positive Kolonien färben sich innerhalb von fünf Minuten rosarot an. HOLBROOK et al. (1980) modifizierten dieses Verfahren, indem sie zuerst die Membran samt Probenmaterial 4 h bei 37 °C auf Minerals Modified Glutamate Agar (MMGA) inkubierten (gute Resultate erbrachte nach RAYMAN et al. (1979) auch die Verwendung von Trypton-Soja-Agar), sodann auf TBA übertrugen und anschließend 18-24 h bei 44 °C bebrüteten. Dieses Vorgehen hatte zwei Gründe:

1. Die Gallensalze im TBA-Agar sowie die sofortige hohe Bebrütungstemperatur von 44 °C scheinen einen inhibitorischen Effekt auf subletal geschädigte Keime auszuüben. Bei vierstündiger Bebrütung bei 37 °C können letztere wiederbelebt werden.

2. Höhere Konzentrationen an Glukose oder anderen Kohlenhydraten im Probenmaterial (HOLBROOK und ANDERSON, 1982), verhindern die Tryptophanase-Synthese und damit die Indolbildung (BEGGS und LICHSTEIN, 1965). Während der Vorinkubation können die Kohlenhydrate in den Nährboden diffundieren und werden so in ihrer auf die Keime wirkenden Konzentration verringert.

Noch nicht abschließend ist geklärt, inwieweit andere Indolpositive Enterobacteriaceae beim Membran-Agar-Verfahren zu falsch positiven Ergebnissen führen können. In erster Linie käme dabei *Klebsiella oxytoca* in Betracht (STENZEL et al., 1972). Obwohl ANDERSON und BAIRD-PARKER (1975) unter 60 getesteten *Klebsiella*-Stämmen keinen fanden, der Indol auch bei 44 °C auf TBA produziert, ist im Hinblick auf die Vielzahl von Literaturangaben über Indolbildung bei 35-37 °C (Tab. 8) nicht auszuschließen, daß diese auch bei 44 °C und auf TBA möglich ist. Wie der Tab. zu entnehmen ist, beträgt der durchschnittliche Prozentsatz Indol-positiver *Klebsiellen* von 15 018 untersuchten Stämmen 14,7 %. In Wasserproben trat dabei mit durchschnittlich 3,3 % der niedrigste, in Fleischproduktproben mit durchschnittlich 53,2 % der höchste Anteil indolbildender *Klebsiella*-Stämme auf. Neben *Klebsiellen* treten zusätzlich eine Reihe weiterer Indol-positiver Enterobacteriaceae auf (Tab. 9), von denen ein hoher Prozentsatz dem Genus *Proteus* angehört. So betrug bei MØLLER (1954) der *Proteus*-Anteil 26,7 % von 86, bei MATSEN und SHERRIS (1969) 54,8 % von 73, bei TRAUB et al. (1970) 50,5 % von 523 und bei ISENBERG und PAINTER (1971) sogar 88,1 % von 219 indolbildenden, nicht zur Spezies *E. coli* gehörenden Keimen. Nach Angaben von MEHLMAN und WENTZ (1984) traten außerdem Probleme mit *Aeromonas hydrophila* auf.

Neben der Möglichkeit falsch positiver Ergebnisse werden als weitere Nachteile des Membran-Agar-Verfahrens genannt: Nichterfassung von *E. coli* Biotyp II und Intermediaten (Indol-negativ; siehe Tab. 3), die 3-5 % der *E. coli*-Stämme ausmachen sollen (RAYMAN et al., 1979); je nach Herkunft und Zusammensetzung der Einzelkomponenten des Nährbodens Hemmung

Tabelle 8: Prozentualer Anteil Indol-positiver Klebsiella-Stämme
(nach Literaturangaben)

Untersuchungs- material	Anzahl der untersuchten Stämme	Indol-posi- tiv (%)	Autor (en)
Klinikproben	8184	13,0	LAUTROP (1956) DARRELL und HURDLE (1964)* EICKHOFF et al. (1966) VON GRAEVENITZ und SCHOENTAG (1968) WOLFE und AMSTERDAM (1968) ZABRANSKY et al. (1969) TRAUB et al. (1970) ISENBERG und PAINTER (1971) MARTIN et al. (1971)* CLOSS und DIGRANES (1971) EDWARDS und EWING (1972) RENNIE und DUNCAN (1974) KLEIN et al. (1975) WEBER et al. (1975) PUPPEL und BAIER (1977)
Milch, Milch- produkte	96	7,3	HELLMANN (1969) ERGÜLLÜ (1983)
Fleischprodukte	596	53,2	STILES und NG (1981a,b)
Wasser	516	3,3	MATSEN et al. (1974) GRABOW et al. (1981)
Teststämme	218	7,3	ØRSKOV (1957) COWAN et al. (1960)*
Verschiedene Materialien	3746	17,8	ØRSKOV (1955) KORTH et al. (1969) MATSEN und SHERRIS (1969) MARTIN et al. (1970) DUNCAN und RAZZELL (1972) STENZEL et al. (1972) BROWN und SEIDLER (1973) RICHARD (1973)* DAVIS und MATSEN (1974) PREAC-MURSIC und METZ (1974) SEIDLER et al. (1975) BAGLEY und SEIDLER (1977) NAEMURA und SEIDLER (1979) TAYLOR et al. (1979) PATTERSON und WOODBURN (1980)
nicht ange- geben	1662	7,4	BROOKE (1951) EDWARDS und FIFE (1952)* HENRIKSEN (1954a) MØLLER (1954)* EDWARDS und FIFE (1955)* BLAZEVIC (1968)

In den mit * gekennzeichneten Arbeiten war die Bebrütungstemperatur nicht angegeben; bei allen anderen lag sie bei 35-37 °C

Tabelle 9: Prozentualer Anteil Indol-positiver Enterobacteriaceae (einschließlich Klebsiellen), die nicht der Spezies E. coli angehören (nach Literaturangaben)

Untersuchungs- material	Bebrütungs- temperatur in °C	Anzahl der untersuchten Proben	Indol-positiv (%)	Autor (en)
Klinikproben	35-37	9578	8,6	VON GRAEVENITZ und SCHOENTAG (1968) WOLFE und AMSTERDAM (1968) ZABRANSKY et al. (1961) TRAUB et al. (1970) ISENBERG und PAINTER (1971) CLOSS und DIGRANES (1971)
Milch, Milch- produkte	37	1185	5,7	HELLMANN (1969) DOMMET (1975) ERGÜLLÜ (1983)
Fleisch- produkte	35 44	2003 555	8,2 4,9	STILES und NG (1981a) ANDERSON und BAIRD-PARKER (1975)
Wasser	36-37	3332	6,4	HENRIKSEN (1954b) * HENRIKSEN (1955) HALLS und AYRES (1974) GRABOW et al. (1981) THOMAS et al. (1955) DELANEY et al. (1962)
Verschiedene Materialien	35-37	5519	4,9	BARDSLEY (1934) BULLING (1965) NUNEZ und COLMER (1968) SCHUBERT und MANN (1968) MATSEN und SHERRIS (1969) MUNDT und RAI (1963) RAYMAN et al. (1979) HENRIKSEN (1954b) PAPAVASSILOU (1958) BLAZEVIC (1968) MØLLER (1954)
Fäzes	44,5	4449	2,7	
nicht ange- geben	* 44 35	2029 285 827	18,4 1,1 12,7	

* keine Angabe der Bebrütungstemperatur

oder nur spärliches Wachstum zahlreicher *E. coli*-Stämme (MEHLMAN und WENTZ, 1984); Abtötung der Kolonien durch das Indolreagenz (ANDERSON und BAIRD-PARKER, 1975); Überwachsen der Membran mit einem diffusen, rosafarbenen Bakterienrasen bei stark mit anderen Enterobacteriaceae außer *E. coli* belastetem Untersuchungsmaterial (SHARPE et al., 1983); störende Einflüsse von Partikeln des Probenmaterials (MEHLMAN und WENTZ, 1984).

Bei Anwendung der Untersuchungsverfahren mit flüssigen Medien (siehe Tab. 6) stören ebenfalls hauptsächlich Klebsiella-Stämme, die auch bei erhöhten Bebrütungstemperaturen noch Laktose verstoffwechseln. So verlief nach BAGLEY und SEIDLER (1977) bei 84,5 % von 58 pathogenen und 15,8 % von 120 nicht pathogenen, bei AUSTIN et al. (1981) bei 9,0 % von 263 Klebsiella-Stämmen der "Fäkalcoliformen" - Test positiv. GRABOW et al. (1981) identifizierten bei "Fäkalcoliformen" einen Klebsiellen-Anteil von 4,0 bis 32,0 % (weitere Literaturangaben finden sich bei RAY und LISTON, 1960, sowie BAGLEY und SEIDLER, 1977). Zwar beobachteten BAGLEY und SEIDLER (1977) einen aus klinischem Material isolierten Klebsiella-Stamm, der bei 44,5 °C Gas aus Laktose und bei 37 °C Indol bildete, doch scheinen beide Eigenschaften bei Klebsiellen in der Regel nicht gleichzeitig aufzutreten (STENZEL et al., 1972). Inwieweit dies auch für andere Coliforme zutrifft, ist noch unklar. SCHUBERT und MANN (1968) fanden keine in beiden Kriterien positiven Enterobacter- und Citrobacter-Stämme. THOMAS et al. (1955) hingegen registrierten unter 707 Coliformen, die nicht der Spezies *E. coli* angehörten 1,3 %, die sowohl Gas aus Laktose als auch Indol bei 44 °C bildeten.

Als die Praktikabilität des Untersuchungsverfahrens mit flüssigen Nährböden wesentlich limitierende Faktoren gelten neben den oben schon angeführten Nachteilen die lange Dauer und der Einsatz verschiedener Nährmedien bei einem Untersuchungsgang. Wenn auch die von SHARPE et al. (1983) genannte Zeit von 10-14 Tagen etwas hoch angesetzt erscheint, so kann z.B. mit dem Verfahren nach ISO (siehe Tab. 6) der Untersuchungsgang unter ungünstigen Umständen bis zu sechs Tagen dauern, wobei drei verschiedene Nährböden zum Einsatz kommen.

3. Eigene Untersuchungen

In den eigenen Untersuchungen sollten vergleichend mit zwei verschiedenen Verfahren

- Most-Probable-Number-Technik und
- Membranverfahren

Erhebungen zum Gehalt von vier verschiedenen Milchprodukten (pasteurisierte Konsummilch, Säuglings- und Kleinkindernahrung auf Trockenmilchbasis, Weichkäse und Schnittkäse) an "Fäkalcoliformen" durchgeführt werden. Unter "Fäkalcoliformen" wurden diejenigen Vertreter der Familie der Enterobacteriaceae verstanden, die bei erhöhten Bebrütungstemperaturen (44 °C) in der Lage sind, Indol aus Tryptophan (Membranverfahren) bzw. zusätzlich auch noch Gas aus Laktose zu bilden (MPN-Technik).

3.1 Material

Das Untersuchungsmaterial entstammte größtenteils dem Einzelhandel. Einige Käseproben wurden von der Bayerischen Landesanstalt für Ernährungswirtschaft in München zu Verfügung gestellt. Acht der 103 Weich- und 21 der 76 Schnittkäseproben waren nach Auskunft der Einzelhandelsfachgeschäfte, in denen sie gekauft worden waren, aus Rohmilch produziert. Eine Aufschlüsselung der untersuchten Milchproben enthält die Tab. 10. Bei der Säuglings- und Kleinkindernahrung handelte es sich um insgesamt 94 Proben von Produkten bundesdeutscher Hersteller.

3.2 Methodik

3.2.1 Vorbereitung der Proben

Die Proben wurden bei Weichkäse als Böhrling, der Rinde und Käseinneres anteilig umfaßte, bei Schnittkäse als Sektor ohne Rinde entnommen. Die Vorbereitung der Proben erfolgte in Anlehnung an die Vorbereitungsnormen für die mikrobiologische Milchuntersuchung des Normenausschuß Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL) im DIN Deutsches Institut für Normung, bei Milch nach DIN 10191/ Teil 1, für Käse gemäß DIN 10191/ Teil 4 unter Verwendung des Verfahrens unter Punkt 7.1.2.3 (Beutelwalkmischer - Stomacher) bzw. bei drei Käseproben nach Punkt 7.1.2.2 (Mixer).

Tabelle 10: Aufschlüsselung der 83 untersuchten Milchproben

Untersuchungsbeginn in Tagen vor dem Ablauf des Mindesthaltbarkeits- datums	Zahl der Proben
0	5
1	7
2	21
3	45
4	5
Fettgehalt	Zahl der Proben
1,5 %	10
3,5 %	71
3,7 %	2

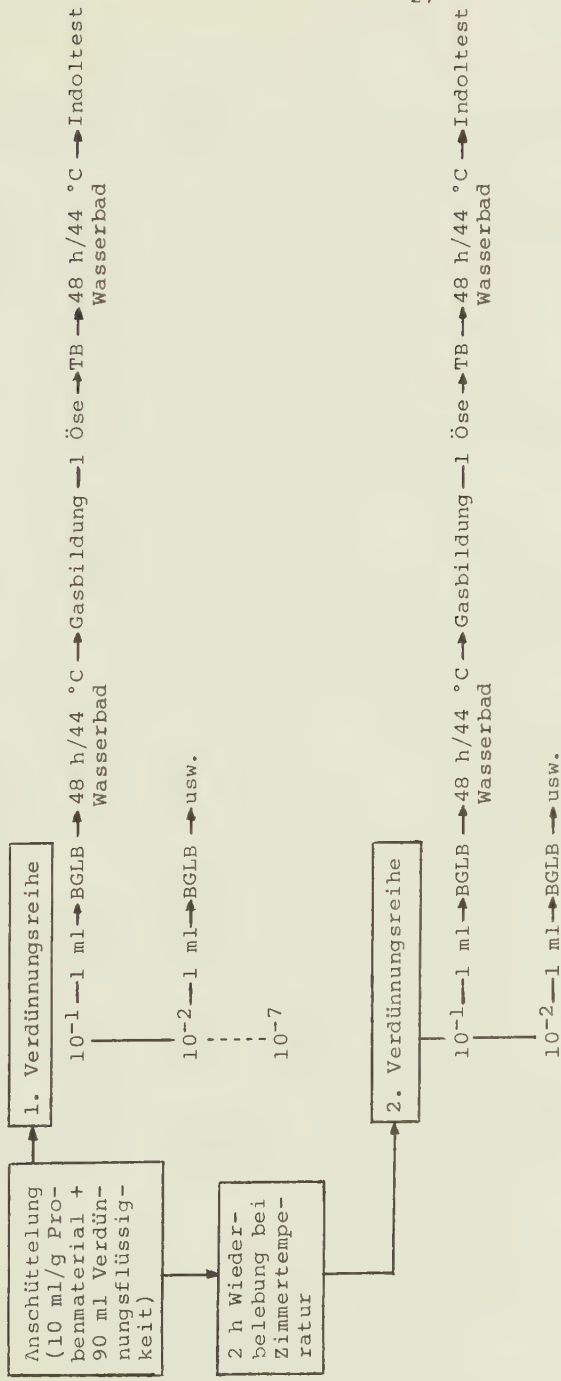
Die Vorbereitung der Säuglings- und Kleinkindernahrung wurde entsprechend DIN 10191/ Teil 2 vorgenommen. Abweichend von diesen Vorschriften betrug die Temperatur der Verdünnungsflüssigkeit bei der Herstellung der Anschüttelung nicht 47 ± 2 °C, sondern 42 - 45 °C. Aus der Anschüttelung wurden von jeder Probe dezimale Verdünnungen hergestellt. (10 ml der Anschüttelung bzw. Verdünnung zu 90 ml steriler und auf 37 °C erwärmter Ringer-Lösung). Da die in DIN 10191/ Teil 4, Punkt 4.2 alternativ für die Untersuchung von Käse mögliche Citrat-Lösung in einigen orientierenden Versuchen keine Vorteile gegenüber Ringer-Lösung brachte, fand letztere auch bei Käse als Verdünnungslösung Verwendung.

3.2.2 Ermittlung der höchstwahrscheinlichen Keimzahl der "Fäkalcoliformen" (Most-Probable-Number-Technik)

Eine Darstellung der Most-Probable-Number-(MPN)-Technik findet sich in Abb. 2.

Je 1 ml der Anschüttelung bzw. der einzelnen Verdünnungsstufen

Abbildung 2: Nachweis von "Fäkalcoliformen" mit einer Most-Probable-Number-Technik



1. Verdünnungsreihe: Bei allen vier Milchprodukten
2. Verdünnungsreihe: Zusätzlich bei Säuglings- und Kleinkindernahrung

BGLB = Brillantgrün-Galle-Laktose-Bouillon
TB = Trypton-Bouillon

wurden in je drei Röhrchen mit 9 ml Brillantgrün-Galle-Laktose-Bouillon (BGLB) und Durham-Röhrchen zum Nachweis der Gasbildung einpipettiert (Milch und Trockenmilchpulver bis zur Verdünnung 10^{-2} , Weichkäse bis 10^{-7} und Schnittkäse bis 10^{-5}). Bei Milch und Trockenmilchpulver wurden, um auch die erwartungsgemäß geringen Keimgehalte zu erfassen, zusätzlich 10 ml der Anschüttelung zu 10 ml doppelt konzentrierter BGLB gegeben. Zur Kontrolle der Nährböden wurde, wie auch bei dem unter 3.2.3 beschriebenen Membranverfahren stets ein *Escherichia coli*-Stamm Biotyp I mitgeführt (Gasbildung bei 44 °C; IMVIC-Test ++--). Nach der Beimpfung wurden die BGLB-Röhrchen 48 h im Wasserbad bei einer Temperatur von 44 °C inkubiert (MACKENZIE et al., 1948). Da im Fall der Säuglings- und Kleinkindernahrung mit einer stärkeren, durch den Herstellungsprozeß bedingten subletalen Schädigung der Keime zu rechnen ist, wurde bei der Untersuchung derartiger Produkte ein Wiederbelebungsschritt vorgeschaltet (zum Problem der subletalen Schädigung siehe die Übersichtsarbeiten von BUSTA (1975), HURST (1977), MOSSEL und CORRY (1977) und RAY (1979)). Zu diesem Zweck wurde in Anlehnung an ein von MOSSEL und RATTO (1970) für die Wiederbelebung von geschädigten Enterobacteriaceae geschildertes Verfahren die Anschüttelung für 2 h bei Zimmertemperatur stehengelassen und anschließend die Verdünnungsreihe in der oben beschriebenen Weise angelegt.

Aus BGLB-Röhrchen, die nach der Inkubation Gasbildung zeigten, wurde mit einer Öse Material in ca. 5 ml Trypton-Bouillon (TB) enthaltende Röhrchen übergeführt und erneut bei 44 °C für 48 h bebrütet. Anschließend erfolgte der Indolnachweis durch Zugabe von je 0,5 ml Kovacs-Reagenz. Aus der Zahl der Indol-positiven Kulturen wurde mit Hilfe einer MPN-Tabelle (DIN 10172/ Teil 1: Mikrobiologische Milchuntersuchung, Bestimmung der coliformen Keime, Referenzverfahren) die höchstwahrscheinliche Keimzahl ermittelt.

3.2.3 Ermittlung der kolonienbildenden Einheiten der "Fäkalcoliformen" (Membranverfahren)

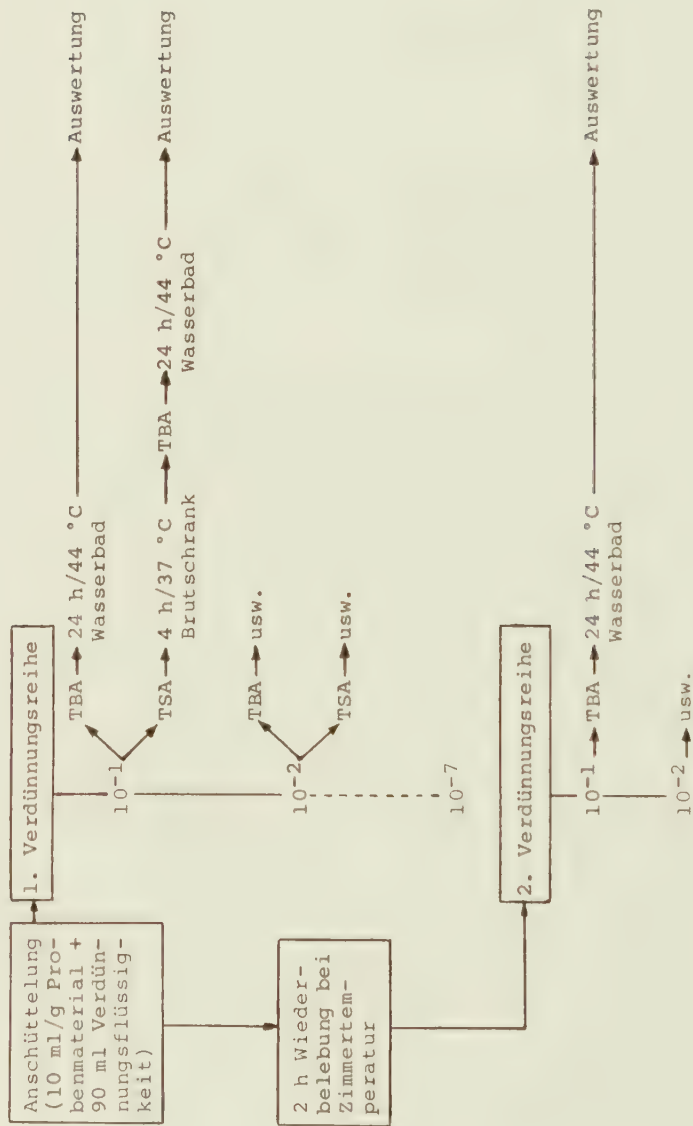
Die kolonienbildenden Einheiten an "Fäkalcoliformen" wurden mit dem ursprünglich auf ANDERSON und BAIRD-PARKER (1975) zurückgehenden Membranverfahren auf drei Wegen bestimmt (siehe Abb. 3):

1. direkter Ansatz auf Trypton-Galle-Agar (TBA)
2. Wiederbelebung auf Trypton-Soja-Agar (TSA) und anschließende Bebrütung auf TBA
3. Wiederbelebung durch Bebrüten der Anschüttelung bei Zimmertemperatur und anschließender Ansatz auf TBA (nur bei Säuglings- und Kleinkindernahrung)

Im einzelnen lief die Untersuchung wie folgt ab:

Auf die gut getrockneten Nährböden (4 h/42 °C im belüfteten Brutschrank) - TBA zum Nachweis von "Fäkalcoliformen" (ANDERSON und BAIRD-PARKER, 1975) und TSA zur Wiederbelebung - wurden Zelluloseacetatmembranen unter sterilen Bedingungen mit der matten Seite nach oben (HOLBROOK und ANDERSON, 1982) gelegt (diese Seite liegt in der Originalpackung oben und ist seit Anfang 1984 mit einem Firmenstempel versehen) und mit einem sterilen Drigalski-Spatel glattgestrichen. Anschließend wurden die Membranen mit je 1 ml jeder Verdünnung beschickt (bei Milch zusätzlich auch mit 1 ml des unverdünnten Materials) und diese mit einem sterilen Drigalski-Spatel gleichmäßig über die Oberfläche der Membran verteilt. Wenn nach 15 bis 30 Minuten die Flüssigkeit vom Nährboden aufgesogen war, erfolgte die Inkubation bei 44 °C (TBA, siehe unten) bzw. die Wiederbelebung über 4 h/37 °C (TSA) (RAYMAN et al., 1979; HOLBROOK et al., 1980; HOLBROOK und ANDERSON, 1982; SHARPE et al., 1983). Von letzterem wurden die Membranen nach der Wiederbelebungsphase mit einer sterilen Pinzette abgehoben und auf TBA-Platten so übertragen, daß zwischen Nährbodenoberfläche und Membran keine Luftblasen entstanden. Ein Glattstreichen mit dem Drigalski-Spatel entfiel, um die Verteilung eventuell schon bestehender Mikrokolonien zu vermeiden

Abbildung 3: Nachweis von "Fäkalcoliformen" mit einem Membranverfahren



1. Verdünnungsreihe: Bei allen vier Milchprodukten
2. Verdünnungsreihe: Zusätzlich bei Säuglings- und Kleinkindernahrung

TSA = Trypton-Soja-Agar
TBA = Trypton-Galle-Agar

(HOLBROOK et al., 1980). Alle TBA-Platten wurden in Tiefgefrierbeuteln zu Stapeln von höchstens fünf Platten 24 h/44 °C in einem Wasserbad bebrütet.

Das Material der 2 h bei Zimmertemperatur zum Zweck der Wiederbelebung bebrüteten Anschüttelung wurde entsprechend verdünnt, auf TBA verbraucht und wie oben beschrieben inkubiert. Nach der Bebrütung wurden zur Auswertung in den gut getrockneten Deckel jeder Petrischale 1-2 ml des Indolreagenzes nach VRACKO und SHERRIS (1963) einpipettiert und die Membranen vom entsprechenden TBA mit Hilfe einer Pinzette eingelegt. Indol-positive Kolonien färbten sich innerhalb von fünf Minuten rot und wiesen einen rosaroten Hof auf. Da der Farbstoff in die Umgebung diffundieren, dort befindliche Indol-negative Kolonien anfärben und somit fälschlicherweise als Indol-positiv darstellen kann (VRACKO und SHERRIS, 1963), erfolgte die Zählung der kolonienbildenden Einheiten nur bei Membranen, die weniger als 150 Kolonien aufwiesen (SHARPE et al., 1981). Die Zahl der Kolonien, multipliziert mit der jeweiligen Verdünnungsstufe, ergab die Anzahl kolonienbildender Einheiten pro g oder ml Probenmaterial.

3.2.4 Herkunft und Zusammensetzung der Nährböden und Reagenzien

Die Zusammensetzung der weniger bekannten Nährböden ist in Tab. 11 wiedergegeben. Alle mit Ausnahme von Trypton-Bouillon konnten als Trockennährböden von der Firma OXOID bezogen werden. Das Indolreagenz nach Kovacs stammte von der Firma MERCK (NR. 9293). Das Indolreagenz nach VRACKO und SHERRIS wurde aus den Einzelkomponenten hergestellt.

Tabelle 11: Herkunft und Zusammensetzung der Medien und Reagenzien für den Nachweis von "Fäkalcoliformen"

Ringerlösung

Fa. OXOID (BR 52)

Brillantgrün-Galle-Laktose-Bouillon (BGLB)

Fa. OXOID (CM 31)

Trypton-Bouillon (TB)

Trypton (Fa. OXOID L 42) 10,0 g

NaCl 5,0 g

Aqua dest. 1000 ml

pH 7,3

Trypton-Soja-Agar (TSA)

Fa. OXOID (CM 131)

Trypton-Galle-Agar (TBA)

Fa. OXOID (CM 595)

Trypton 20,0 g

Gallensalze 1,5 g

Agar 1,5 g

Aqua dest. 1000 ml

pH 7,2

Indol-Reagenz nach VRACKO und SHERRIS

4-dimethylaminobenzaldehyd ($C_9H_{11}NO$) 5,0 g

Fa. MERCK (Nr. 3058)

1 N HCl 100,0 g

Zelluloseacetatmembranen

Fa. OXOID (Nuflow 85/45 UNI)

85 mm Durchmesser, 450 nm Porenweite

3.3 Ergebnisse

Die untere Nachweisgrenze lag in Abhängigkeit von der Art des untersuchten Probenmaterials bei Verwendung der MPN-Technik bei einer wahrscheinlichsten Keimzahl von 0,3/ml bzw. g (pasteurisierte Konsummilch bzw. Säuglings- und Kleinkindernahrung auf Trockenmilchbasis) oder 3/g (Schnitt- und Weichkäse), die obere Nachweisgrenze bei einer solchen von 110/ml bzw. g (pasteurisierte Konsummilch bzw. Säuglings- und Kleinkindernahrung), 110×10^3 /g (Schnittkäse) bzw. 110×10^5 /g (Weichkäse). Bei Verwendung des Membranverfahrens betrug die untere Nachweisgrenze für pasteurisierte Konsummilch bzw. Säuglings- und Kleinkindernahrung 1/ml bzw. g, für Weich- und Schnittkäse 10/g. Die obere Nachweisgrenze lag bei einer Keimzahl von 150×10^2 /ml bzw. g (pasteurisierte Konsummilch bzw. Säuglings- und Kleinkindernahrung), 150×10^5 /g (Schnittkäse) bzw. 150×10^7 /g (Weichkäse).

Zur Feststellung signifikanter Unterschiede zwischen den Mittelwerten wurde der einfache t - Test herangezogen. Die Ermittlung des Wahrscheinlichkeitsgrades, mit dem Unterschiede statistisch gesichert sind, erfolgte unter Zuhilfenahme der Wissenschaftlichen Tabellen - Documenta Geigy - 6. Auflage (1960). Von einer zusätzlichen Verwendung des t - Tests für paarige Stichproben mußte abgesehen werden, da sich beim Vergleich einer erheblichen Zahl von Einzelwerten keine oder negative Differenzen ergaben.

3.3.1 Pasteurisierte Konsummilch

In keiner der 83 untersuchten Proben pasteurisierter Konsummilch konnten mit der MPN-Technik bzw. dem Membranverfahren "Fäkalcoliforme" nachgewiesen werden ($<0,3/\text{ml}$ bzw. g; $<1/\text{ml}$ bzw. g).

3.3.2 Säuglings- und Kleinkindernahrung auf Trockenmilchbasis

Nur in zwei der insgesamt 94 Proben wurden "Fäkalcoliforme" gefunden (Tab. 12).

Tabelle 12: Zahl der "Fäkalcoliformen"/g in zwei Proben
Säuglings- und Kleinkindernahrung

Proben nummer	MPN-Technik*		Membranverfahren Untersuchungsgang**		
	ohne Wieder- belebung	mit Wieder- belebung 3	1	2	3
81	> 110	> 110	130	260	100
94	$< 0,3$	> 110	< 10	10	900

* siehe 3.2.2

** 1 = ohne Wiederbelebung, 2 = Wiederbelebung auf TSA,
3 = Wiederbelebung in Anschüttelung (siehe 3.2.3)

3.3.3 Schnittkäse

Bei der Untersuchung der 76 Schnittkäse-Proben ließen sich mit der MPN-Technik in 25 (32,9 %) Proben "Fäkalcoliforme" nachweisen ($\geq 3/\text{g}$). Davon enthielten 7 (9,2 %) weniger als

10 Keime/g, 11 (14,5 %) lagen im Keimgehaltsbereich zwischen 10/g und 10^2 /g, 7 (9,2 %) Proben enthielten mindestens 10^2 Keime/g (Tab. 13; Abb. 4). Bei Anwendung des Membranverfahrens ohne Wiederbelebung konnten "Fäkalcoliforme" in 18 (23,7 %) Proben nachgewiesen werden (≥ 10 /g). Davon enthielten 11 (14,5 %) mindestens 10^2 Keime/g, wovon 4 (5,3 %) Proben im Keimgehaltsbereich von 10^3 /g und 2 (2,6 %) Proben im Bereich von 10^4 /g lagen (Tab. 13; Abb. 4).

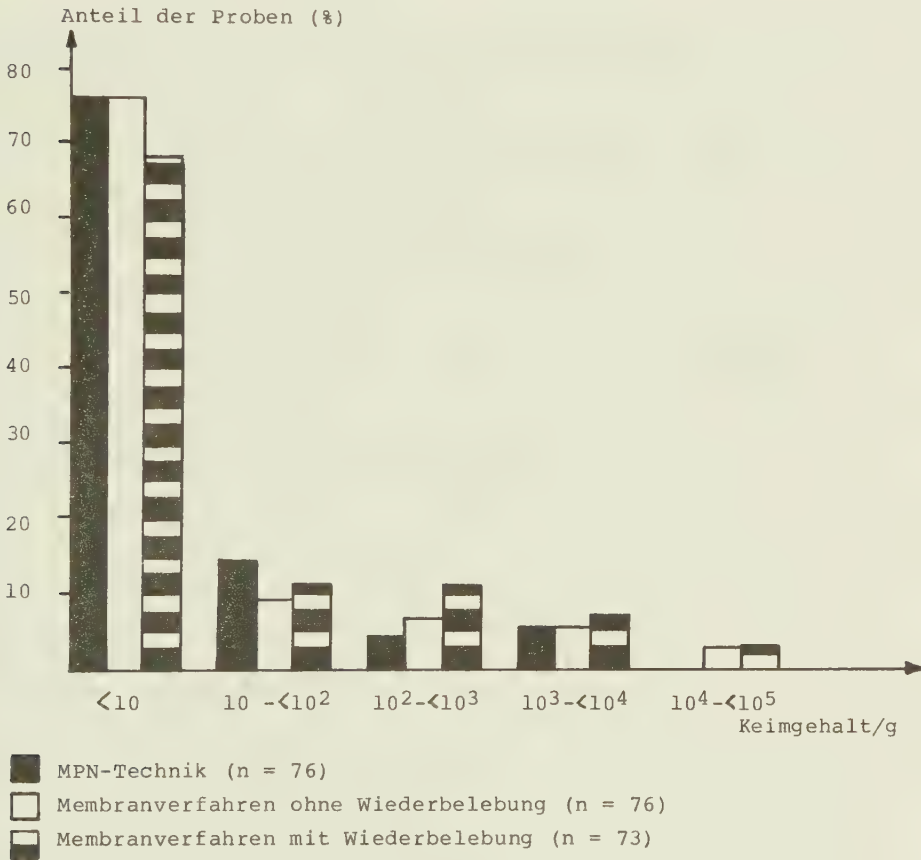
Von den 76 Schnittkäseproben, die mit dem Membranverfahren mit Wiederbelebung untersucht worden waren, konnten wegen technischer Probleme ("Untergehen" der Petrischalen im Wasserbad) nur 73 Proben ausgewertet werden. In 23 (31,5 %) Proben ließen sich dabei "Fäkalcoliforme" nachweisen, wobei 15 (20,5 %) mindestens 10^2 Keime/g enthielten. 5 (6,8 %) bzw. 2 (2,7 %) Proben lagen im Keimgehaltsbereich von 10^3 /g bzw. 10^4 /g (Tab. 13; Abb. 4).

Berücksichtigt man die Art des Ausgangsmaterials (rohe bzw. wärmebehandelte Milch), so zeigt sich, daß "Fäkalcoliforme" in den aus wärmebehandelter Milch hergestellten Schnittkäsen sowohl mit der MPN-Technik als auch mit dem Membranverfahren ohne bzw. mit Wiederbelebung häufiger nachgewiesen werden konnten als in den aus roher Milch hergestellten Schnittkäsen. (34,6 % gegenüber 28,6 % bei der MPN-Technik, 25,5 % gegenüber 19,2 % bzw. 32,7 % gegenüber 28,6 % beim Membranverfahren ohne bzw. mit Wiederbelebung). Die Anteile der Proben aus wärmebehandelter bzw. roher Milch mit Keimzahlen von mindestens 10^2 /g stimmten bei Verwendung der MPN-Technik und des Membranverfahrens ohne Wiederbelebung nahezu überein (9,1 % bzw. 9,6 % bei der MPN-Technik, 14,6 % bzw. 14,4 % beim Membranverfahren ohne Wiederbelebung). Beim Nachweis durch das Membranverfahren mit Wiederbelebung belief sich der Anteil der Proben aus wärmebehandelter Milch mit Keimzahlen von mindestens 10^2 /g auf 19,2 % gegenüber 23,8 % der Proben aus roher Milch. In diesem Fall wurden "Fäkalcoliformen" - Gehalte von 10^4 /g allein in Produkten aus wärmebehandelter Milch gefunden, und zwar bei 2 (3,8 %) Proben (Tab. 13).

Tabelle 13: Vergleich der Gehalte an "Fäkalcoliformen" in Schnittkäse aus wärmebehandelter Milch (w) und Rohmilch (r) bei Anwendung der MPN-Technik und des Membran-verfahrens ohne bzw. mit Wiederbelebung

Keimgehalt pro g	Anteil (%) der Proben mit "Fäkalcoliformen"			Membranverfahren			
	MPN-Technik			ohne Wiederbelebung		mit Wiederbelebung	
	w (n=55)	r (n=21)	total (n=76)	w (n=55)	r (n=21)	w (n=52)	r (n=21) total (n=73)
<3	65,4	71,4	67,1	74,5	80,8	67,3	71,4 68,5
3 - <10 ¹	9,1	9,5	9,2				
10 ¹ - <10 ²	16,4	9,5	14,5	10,9	4,8	13,5	4,8 11,0
10 ² - <10 ³	3,6	4,8	3,9	7,3	4,8	9,6	14,3 11,0
10 ³ - <10 ⁴	5,5	4,8	5,3	5,5	4,8	5,8	9,5 6,8
10 ⁴ - <10 ⁵	-	-	-	1,8	4,8	3,8	- 2,7

Abbildung 4: Häufigkeitsverteilung der Keimzahlen von
"Fäkalcoliiformen" in 76 Schnittkäse - Proben



3.3.3.1 Vergleich von MPN-Technik und Membranverfahren bei Parallelproben von Schnittkäse

Es kamen 73 Schnittkäseproben zur Auswertung, die in Parallelansätzen mit Membranverfahren ohne bzw. mit Wiederbelebungs-schritt untersucht worden waren. Desgleichen wurden die Ergebnisse von 76 mit MPN-Technik bzw. Membranverfahren ohne Wiederbelebungs-schritt untersuchten Schnittkäseproben gegenübergestellt (Tab. 14). Das Membranverfahren mit bzw. ohne Wiederbelebungs-schritt lieferte bei 50 (68,5 %) Proben gleiche Keimzahlen. Bei Untersuchung mit MPN-Technik bzw. Membranverfahren ohne Wiederbelebungs-schritt traten ebenfalls bei 50 (65,8 %) Proben gleiche "Fäkalcoliformen" - Gehalte auf. Das Membranverfahren mit Wiederbelebungs-schritt lieferte bei 18 (24,7 %) Proben höhere Keimzahlen als das Membranverfahren ohne Wiederbelebungs-schritt, während der umgekehrte Fall nur bei 5 (6,8 %) Proben eintrat. Zwischen MPN-Technik und Membranverfahren ohne Wiederbelebungs-schritt waren diese Unterschiede nicht so deutlich ausgeprägt (Tab. 14). Um die Abweichungen zwischen den einzelnen Methoden quantitativ genauer zu erfassen, wurden in Anlehnung an RAYMAN et al. (1979) die mit jeweils zwei Methoden in Parallelansätzen ermittelten Keimzahlen dividiert und die erhaltenen Quotienten dekadisch logarithmiert. So erhält man bei Keimzahlgleichheit den Wert Null, ansonsten positive bzw. negative Zahlen, die, nach Größe und Häufigkeit geordnet, in Abb. 5 und 6 dargestellt sind. Da für die angegebenen Berechnungen sowie die weitere statistische Auswertung die Angaben " <3 Keime/g" bzw. " <10 Keime/g" für Keimzahlen unterhalb der methodenbedingten Nachweisgrenzen unbrauchbar sind, wurde stattdessen im Folgenden jeweils "1 Keim/g" eingesetzt.

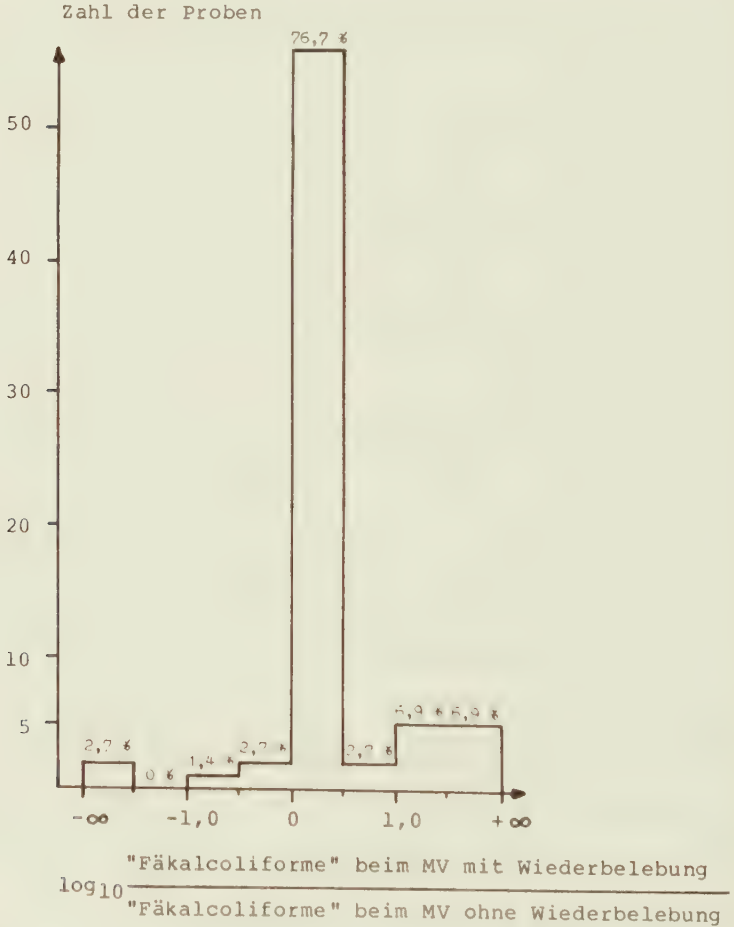
Wie man Abb. 5 entnehmen kann, unterscheiden sich die dekadischen Logarithmen beim Vergleich des Membranverfahrens mit und ohne Wiederbelebungs-schritt bei 61 (83,5 %) Proben um höchstens den Wert eins. Zieht man hiervon die in Tab. 14 aufgeführten 50 (68,5 %) Proben mit gleichen Keimzahlen

Tabelle 14: Vergleich der "Fäkalcoliformen" - Gehalte in Schnittkäse bei Anwendung von MPN-Technik und Membranverfahren (MV) *

Vergleich zwischen MV mit und ohne Wiederbelebung	Zahl der Proben (%) (n = 73)
MV mit Wie- > MV ohne Wie- derbelebung derbelebung	18 (24,7)
MV mit Wie- < MV ohne Wie- derbelebung derbelebung	5 (6,8)
MV mit Wie- = MV ohne Wie- derbelebung derbelebung	50 (68,5)
Vergleich zwischen MPN-Technik und MV ohne Wiederbelebung	Zahl der Proben (%) (n = 76)
MPN-Technik > MV ohne Wie- derbelebung	11 (14,5)
MPN-Technik < MV ohne Wie- derbelebung	15 (19,7)
MPN-Technik = MV ohne Wie- derbelebung	50 (65,8)

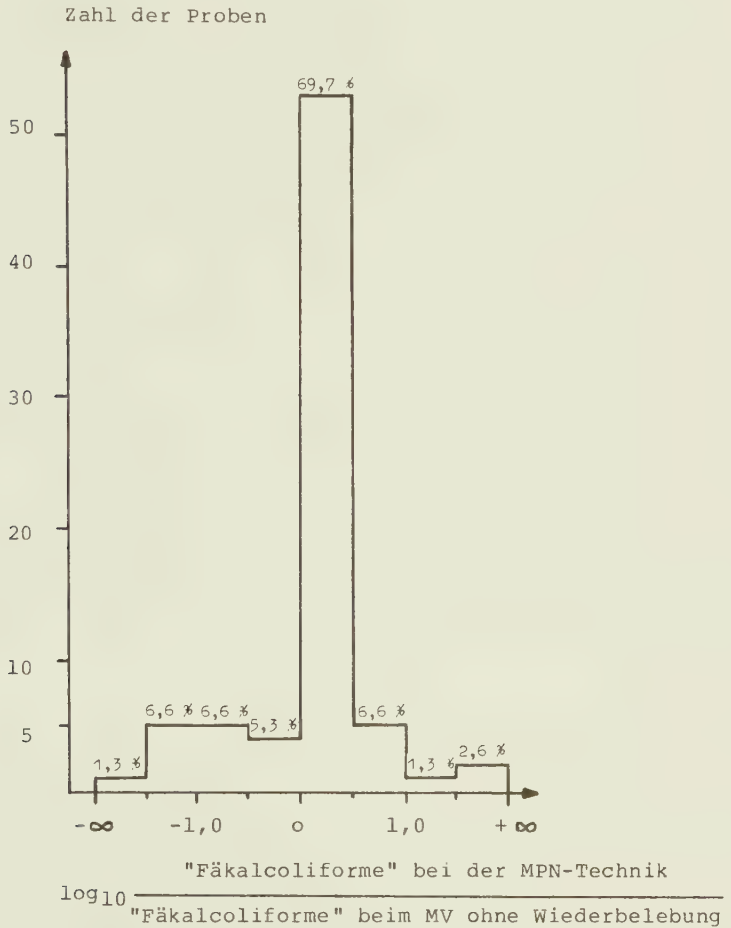
* Negative Proben gehen in die Berechnung mit ein

Abbildung 5: Häufigkeitsverteilung der dekadischen Logarithmen von "Fäkalcoliformen" - Zahlen in 73 Schnittkäse-Proben bei Bestimmung mit Membranverfahren ohne bzw. mit Wiederbelebung *



* Werte, die auf Klassengrenzen fielen, wurden jeweils der rechten Klasse zugeordnet

Abbildung 6: Häufigkeitsverteilung der dekadischen Logarithmen von "Fäkalcoliformen"-Zahlen in 76 Schnittkäse-Proben bei Bestimmung mit MPN-Technik und Membranverfahren ohne Wiederbelebung *



* siehe Abb. 5

bei beiden Verfahren ab, so erhält man 11 (15,0 %) Proben, bei denen die gefundenen Keimzahlen einen tatsächlichen Unterschied von höchstens einer Zehnerpotenz aufwiesen. Andererseits lieferte bei 10 (13,8 %) Proben das Verfahren mit Wiederbelebung um mindestens eine Zehnerpotenz höhere, jedoch nur bei 2 (2,7 %) Proben um mindestens eine Zehnerpotenz niedrigere Keimzahlen als das Verfahren ohne Wiederbelebung. Die beiden extremsten Werte betrugen dabei + 2,51 bzw. - 1,56. Beim in Abb. 6 dargestellten Vergleich zwischen MPN-Technik und Membranverfahren ohne Wiederbelebung unterschieden sich die Logarithmen bei 67 (88,2 %) Proben um höchstens eins. Dies ergibt nach Abzug der 50 (65,8 %) Proben mit Keimzahlgleichheit 17 (22,4 %) Proben, bei denen die Keimzahlen tatsächlich um höchstens eine Zehnerpotenz differierten. Weiter erkennt man, daß bei 6 (7,9 %) Proben die MPN-Technik um mindestens eine Zehnerpotenz niedrigere, jedoch nur bei 3 (3,9 %) Proben um mindestens eine Zehnerpotenz höhere Keimzahlen erbrachte als das Membranverfahren ohne Wiederbelebung. Die extremsten Werte betrugen dabei + 2,18 bzw. - 1,60. Bei der Bestimmung der "Fäkalcoliformen" - Gehalte in Schnittkäseproben unterschieden sich die durch MPN-Technik bzw. Membranverfahren ohne Wiederbelebung sowie Membranverfahren ohne und mit Wiederbelebung in Parallelansätzen ermittelten Keimgehalte/g nicht signifikant.

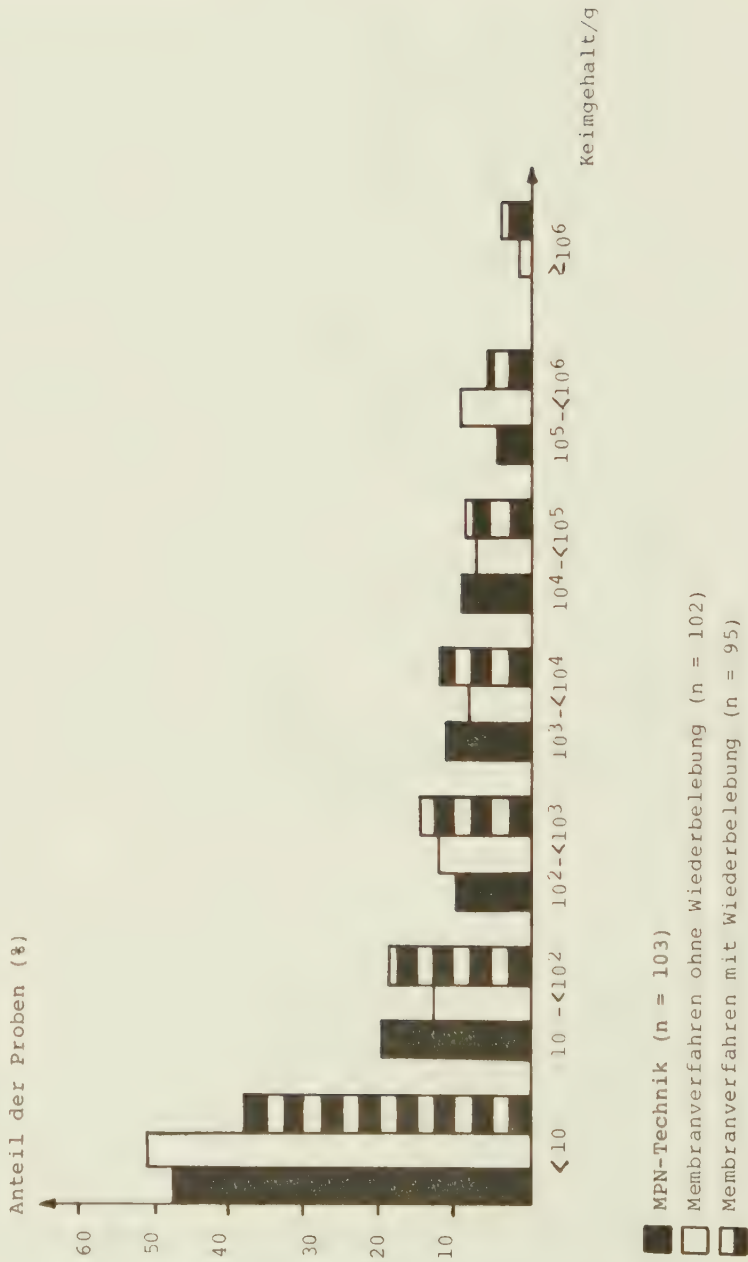
3.3.4 Weichkäse

Bei der Untersuchung der 103 Weichkäse-Proben konnten mit der MPN-Technik in 72 (69,9 %) Proben "Fäkalcoliforme" nachgewiesen werden (≥ 3 /g). Davon enthielten 18 (17,5 %) Proben weniger als 10 Keime/g, 20 (19,4 %) lagen im Keimgehaltsbereich zwischen 10/g und 10^2 /g, 34 (33,0 %) enthielten mindestens 10^2 "Fäkalcoliforme"/g. Vier dieser Proben (3,9 %) enthielten mindestens 10^5 Keime/g (Tab. 15; Abb. 7). Von den 103 Weichkäseproben, die mit dem Membranverfahren ohne Wiederbelebung untersucht worden waren, konnte eine, von den 103 mit dem Membranverfahren mit Wiederbelebung untersuchten

Tabelle 15: Vergleich der Gehalte an "Fäkalcoliformen" in 41 Weichkäseproben mit Schmiere- (Schm) und 62 mit Schimmelflora (Schi) bei Untersuchung mit MPN-Technik und Membranverfahren ohne bzw. mit Wiederbelebungs

Keimgehalt pro g	Anteil (%) der Proben mit "Fäkalcoliformen"			Membranverfahren		
	MPN-Technik			mit Wiederbelebungs		
	Schm (n=41)	Schi (n=62)	total (n=103)	ohne Wiederbelebungs Schm (n=41)	Schi (n=61)	total (n=102)
< 3	21,9	35,5	30,1			
3 - < 10 ¹	19,5	16,1	17,5	46,3	54,1	51,0
10 ¹ - < 10 ²	29,3	12,9	19,4	21,9	6,6	12,7
10 ² - < 10 ³	17,1	4,8	9,7	17,1	8,2	11,8
10 ³ - < 10 ⁴	9,8	11,3	10,7	4,9	9,8	7,8
10 ⁴ - < 10 ⁵	-	14,5	8,7	4,9	8,2	6,9
10 ⁵ - < 10 ⁶	2,4	4,9	3,9	4,9	11,5	8,8
≥ 10 ⁶	-	-	-	-	1,6	1,0
$\bar{x}_g$	3,4x10	5,8x10	4,7x10	2,2x10	5,1x10	3,6x10
				6,4x10	8,9x10	7,8x10

Abbildung 7: Häufigkeitsverteilung der Keimzahlen von
"Fäkalcoliformen" in 103 Weichkäse-Proben



Proben acht wegen technischer Probleme ("Untergehen" der Petrischalen im Wasserbad) nicht ausgewertet werden. Bei Verwendung des Membranverfahrens ohne Wiederbelebung konnten in 50 (49,0 %) von 102 Proben, beim Membranverfahren mit Wiederbelebung in 59 (62,1 %) von 95 Proben "Fäkalcoliforme" nachgewiesen werden. Der Anteil von Proben mit weniger als 10^2 Keimen/g betrug 13 (12,7 %) bzw. 18 (18,9 %) bei Verwendung des Membranverfahrens ohne bzw. mit Wiederbelebung. In 25 (24,5 %) bzw. 27 (28,5 %) Proben ließen sich mindestens 10^3 "Fäkalcoliforme"/g nachweisen. 10 (9,8 %) bzw. 8 (8,5 %) dieser Proben enthielten mindestens 10^5 Keime/g (Tab. 15; Abb. 7). Zwischen Weichkäse mit Schmiere (41 Proben) bzw. mit Schimmel (62 Proben) als Oberflächenflora konnten im "Fäkalcoliformen" - Gehalt mit den einzelnen Nachweismethoden Unterschiede festgestellt werden. Proben mit weniger als 10^3 Keimen/g waren bei Produkten mit Schimmel seltener, während für Keimzahlen über 10^3 /g das Gegenteil zutraf. "Fäkalcoliformen" - Gehalte von über 10^6 /g ließen sich mit dem Membranverfahren ohne Wiederbelebung nur in einer Weichkäse-Probe mit Schimmel, mit dem Membranverfahren mit Wiederbelebung in einer Probe mit Schmiere, aber in zwei Proben mit Schimmel nachweisen. Die Mittelwerte der MPN bzw. der Zahl kolonienbildender Einheiten "Fäkalcoliformer" waren bei Weichkäse mit Schmiere bzw. Schimmel bei Untersuchung mit MPN-Technik und Membranverfahren ohne bzw. mit Wiederbelebung etwa gleich ($3,4 \times 10$ /g bzw. $5,8 \times 10$ /g, $2,2 \times 10$ /g bzw. $5,1 \times 10$ /g, $6,4 \times 10$ /g bzw. $8,9 \times 10$ /g).

Den Vergleich der Produktionsstätten (Inland - Ausland) zeigt Tab. 16. Dabei fällt auf, daß mit allen drei Nachweisverfahren in den 62 deutschen Produkten höhere "Fäkalcoliformen" - Gehalte festgestellt wurden als in den 41 ausländischen Erzeugnissen (Im Durchschnitt wiesen ca. 45 % der inländischen, aber nur ca. 20 % der ausländischen Produkte mindestens 10^2 Keime/g auf). Deshalb waren auch die geometrischen Mittelwerte der MPN bzw. der Zahlen kolonienbildender Einheiten/g bei den in Deutschland hergestellten Erzeugnissen höher (Tab. 16). Die Unterschiede ließen sich allerdings nur für die mit dem Mem-

Tabelle 16: Vergleich der Gehalte an "Fäkalcoliformen" in 62 inländischen (i) und 41 ausländischen (a) Weichkäseproben bei Untersuchung mit MPN-Technik und Membranverfahren ohne bzw. mit Wiederbelebungs

Keimgehalt pro g	Anteil (%) der Proben mit "Fäkalcoliformen"			
	MPN-Technik (n=62)		Membranverfahren (n=41)	
	i (n=62)	a (n=41)	ohne Wiederbelebungs i (n=61)	mit Wiederbelebungs i (n=54)
< 3	19,4	46,3		
3 - < 10 ¹	19,3	14,6	41,0	65,9
10 ¹ - < 10 ²	21,0	17,1	11,5	14,6
10 ² - < 10 ³	12,9	4,9	18,0	2,4
10 ³ - < 10 ⁴	14,5	4,9	13,1	-
10 ⁴ - < 10 ⁵	9,7	7,3	8,2	4,9
10 ⁵ - < 10 ⁶	3,2	4,9	6,6	12,2
≥ 10 ⁶	-	-	1,6	-
$\bar{x}_g$	8,3x10	2,0x10	6,9x10	1,4x10
				1,8x10 ²
				2,6x10

branverfahren mit Wiederbelebung ermittelten "Fäkalcoli-formen" - Gehalte mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ statistisch absichern.

3.3.4.1 Vergleich zwischen MPN-Technik und Membranverfahren bei Parallelproben von Weichkäse

Es wurden 95 Weichkäseproben parallel mit MPN-Technik und Membranverfahren ohne Wiederbelebung, 102 Proben vergleichend mit Membranverfahren ohne bzw. mit Wiederbelebung untersucht. Die jeweils verglichenen Verfahren lieferten bei 36 (37,9 %) bzw. 29 (28,4 %) Proben gleiche "Fäkalcoliformen" - Zahlen. Das Membranverfahren mit Wiederbelebung erbrachte bei 43 (45,3 %) Proben höhere, aber nur bei 16 (16,8 %) Proben niedrigere Keimzahlen als das Verfahren ohne Wiederbelebung. Im Vergleich zwischen MPN-Technik und Membranverfahren ohne Wiederbelebung führte die MPN-Technik bei 41 (40,2 %) Proben zu höheren und bei 32 (31,4 %) zu niedrigeren Keimzahlen als das Membranverfahren ohne Wiederbelebung (Tab. 17).

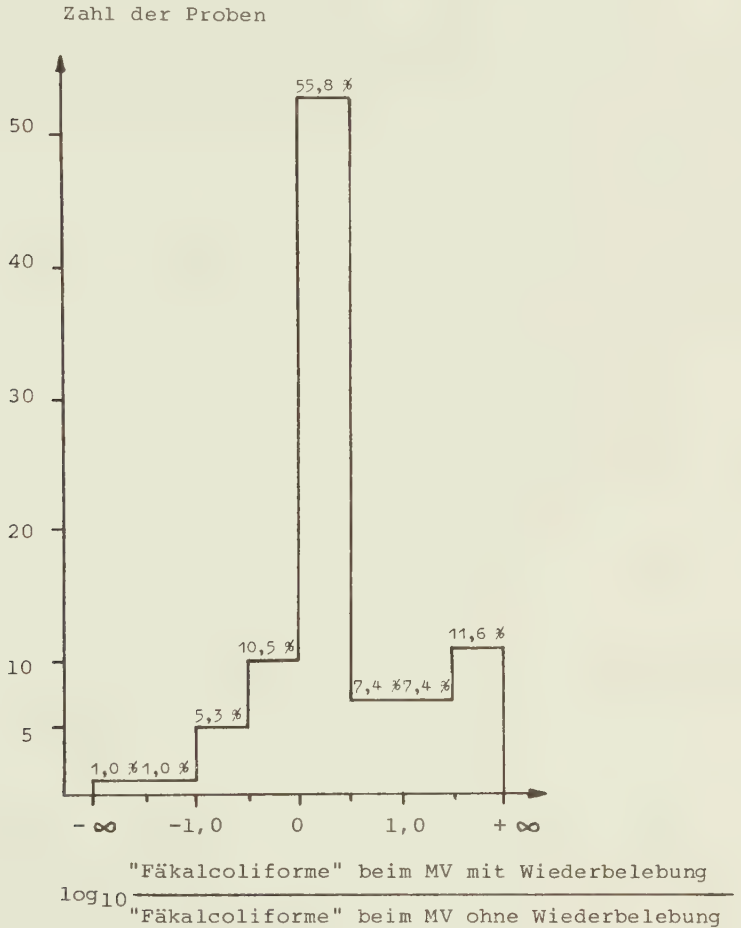
Die schon unter Punkt 3.3.4.1 beschriebene logarithmische Darstellung der Keimzahlquotienten nach RAYMAN et al. (1979) ist in Abb. 8 und 9 dargestellt. Aus Abb. 8 erkennt man, daß sich die im Membranverfahren mit bzw. ohne Wiederbelebung ermittelten Keimgehalte/g bei 75 (79,0 %) Proben um höchstens eine Zehnerpotenz unterschieden. Nach Abzug der 36 (37,9 %) Proben mit Keimzahlgleichheit (Tab. 17) ergeben sich 39 (41,1 %) Proben mit einem tatsächlichen Keimzahlunterschied von höchstens einer Zehnerpotenz. Bei 18 (19,0 %) Proben lieferte das Membranverfahren mit Wiederbelebung Keimzahlen, die das Zehnfache der beim Membranverfahren ohne Wiederbelebung ermittelten Werte überstiegen. Der umgekehrte Fall trat bei 2 (2,0 %) Proben auf. Die beiden extremsten Werte für die Logarithmen der Keimzahlquotienten betrugen + 4,08 bzw. - 1,70. Bei 78 (76,5 %) Proben differierten die mit MPN-Technik bzw. Membranverfahren ohne Wiederbelebung gefundenen Keimzahlen um

Tabelle 17: Vergleich der "Fäkalcoliformen" - Gehalte in Weichkäse bei Anwendung von MPN-Technik und Membranverfahren (MV) *

Vergleich zwischen MV mit und ohne Wiederbelebungsung	Zahl der Proben (%) (n = 95)
MV mit Wie-derbelebungsung > MV ohne Wie-derbelebungsung	43 (45,3)
MV mit Wie-derbelebungsung < MV ohne Wie-derbelebungsung	16 (16,8)
MV mit Wie-derbelebungsung = MV ohne Wie-derbelebungsung	36 (37,9)
Vergleich zwischen MPN-Technik und MV ohne Wiederbelebungsung	Zahl der Proben (%) (n = 102)
MPN-Technik > MV ohne Wie-derbelebungsung	41 (40,2)
MPN-Technik < MV ohne Wie-derbelebungsung	32 (31,4)
MPN-Technik = MV ohne Wie-derbelebungsung	29 (28,4)

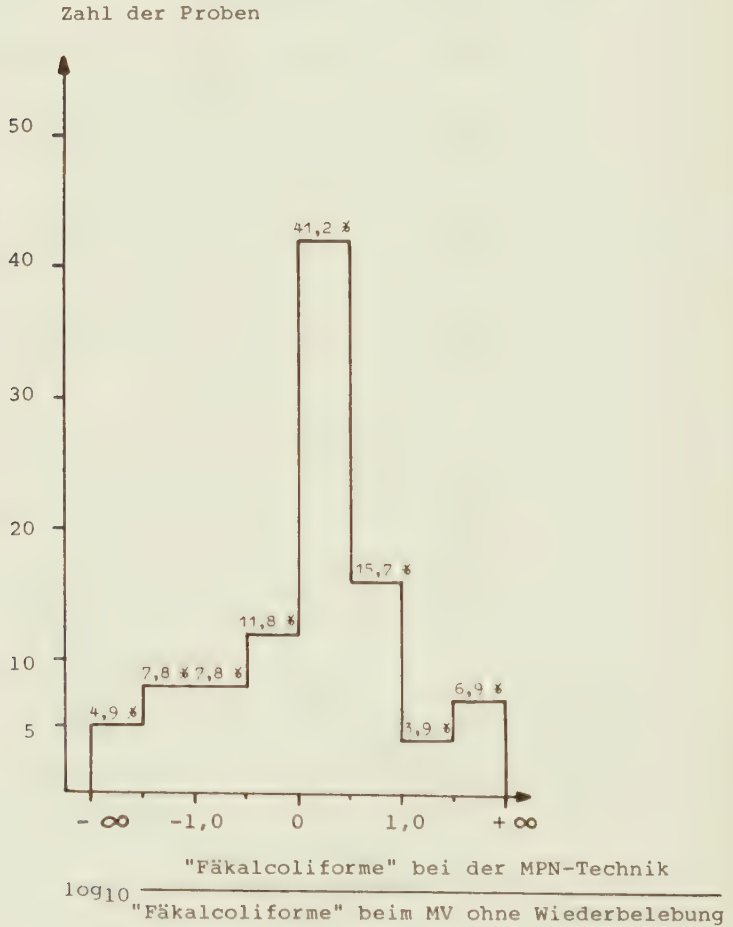
* Negative Proben gehen in die Berechnung mit ein

Abbildung 8: Häufigkeitsverteilung der dekadischen Logarithmen von "Fäkalcoliformen" - Zahlen in 95 Weichkäse-Proben bei Bestimmung mit Membranverfahren mit bzw. ohne Wiederbelebung *



* siehe Abb. 5

Abbildung 9: Häufigkeitsverteilung der dekadischen Logarithmen von "Fäkalcoliformen" - Zahlen in 102 Weichkäse-Proben bei Bestimmung mit MPN-Technik bzw. Membranverfahren ohne Wiederbelebung *



* siehe Abb. 5

höchstens eine Zehnerpotenz, wobei nach Abzug der 29 (28,4 %) Proben mit Keimzahlgleichheit (Tab. 17) bei 49 (48,1 %) Proben ein tatsächlicher Unterschied von höchstens einer Zehnerpotenz auftrat (Abb. 9). Bei 11 (10,8 %) bzw. 13 (12,7 %) Proben lagen die mit der MPN-Technik ermittelten "Fäkalcoliformen" - Gehalte um mehr als eine Zehnerpotenz höher bzw. niedriger als beim Membranverfahren ohne Wiederbelebung. Die extremsten Werte für die Logarithmen betrugen + 3,40 bzw. - 3,18.

4. Besprechung der Ergebnisse und Diskussion

In der Milchwirtschaft wird bereits seit langem der Nachweis der Coliformen mit der Absicht durchgeführt, bestimmte technologische bzw. produktionshygienische Maßnahmen und Gegebenheiten zu überprüfen ("Good Manufacturing Practice"). Ein klassisches Beispiel hierfür ist die in den USA seit etwa 1920 empfohlene Untersuchung von pasteurisierter Milch auf coliforme Keime, um das Ausmaß einer Rekontamination abschätzen zu können und damit letztlich einen Überblick über die Effizienz der nach dem Erhitzer wirksam gewordenen Gesamtheit aller hygienischen Maßnahmen zu bekommen (McCRADY und LANGEVIN, 1932). Entsprechend der 1977 von INGRAM erstmals formulierten Definition der "Markerkeime" (MOSSEL et al., 1978; MOSSEL, 1981) fungierten also die Coliformen im milchwirtschaftlichen Bereich bisher als Indikatormikroorganismen. Seit 1971 in den Vereinigten Staaten eine Serie von Gastroenteritisausbrüchen beobachtet wurde, die auf den Genuß von mit enteroinvasiven *Escherichia (E.) coli* kontaminierte Käse zurückzuführen war, hat sich bei solchen Milchprodukten diese Zielrichtung gewandelt. Man suchte nach einem geeigneten Mittel die Gefahr einer Gesundheitsgefährdung des Konsumenten durch Käse so gering wie möglich zu halten und glaubte, dies durch eine Limitierung der Gehalte an Coliformen, speziell "Fäkalcoliformen" in den Produkten erreichen zu können. Ein Dreiklassenplan, der solche Grenzwerte festlegt, wurde 1977 in Kanada veröffentlicht (COLLINS-THOMPSON et al., 1977) (siehe Tab. 18) und fand inzwischen weltweite Beachtung, insbesondere im Zusammenhang mit Ex- und Importbeschränkungen. Eine von der Canadian Health Protection Branch, Ottawa, 1983 durchgeführte Modifikation findet sich in Tab. 19. Der Schwerpunkt liegt seither nicht mehr auf der Indikator- sondern auf der Indexfunktion (im Sinne von INGRAM, 1977) der in Tab. 18 und 19 genannten Keimgruppen.

Seit der Veröffentlichung wird das Konzept kontrovers diskutiert, wobei die Frage ob Coliforme, "Fäkalcoliforme" und *E. coli* tatsächlich als Index für eine mögliche Belastung des

Tabelle 18: Probennahmepläne und mikrobiologische Standards in Kanada für aus pasteurisierter und nicht pasteurisierter Milch hergestellte Käse (nach COLLINS-THOMPSON et al., 1977)

Nachweis	Käse aus							
	pasteurisierter Milch				nicht pasteurisierter Milch			
	n	c	m	M	n	c	m	M
Coliforme	5	2	500	1500	5	2	5000	50000
"Fäkalcoliforme"	5	2	100	500	5	2	500	1000

n = Anzahl der zu untersuchenden Parallelproben

c = Höchstzahl der Parallelproben, die den Grenzwert m überschreiten dürfen

m = Keimzahl/g, die maximal von c Parallelproben überschritten werden darf

M = Keimzahl/g, die von keiner Parallelprobe überschritten werden darf

Tabelle 19: Probenpläne und mikrobiologische Standards in Kanada für aus pasteurisierter und nicht pasteurisierter Milch hergestellte Käse (Health Protection Branch, Ottawa, 1983)

Nachweis	Käse aus							
	pasteurisierter Milch				nicht pasteurisierter Milch			
	n	c	m	M	n	c	m	M
E. coli	5	2	100	2000	5	2	500	2000

Legende siehe Tab. 18

Untersuchungsmaterials mit enteropathogenen *E. coli*-Stämmen geeignet sind eine zentrale Stellung einnimmt. Kritik wurde außerdem an den Grenzkeimzahlen selbst geübt, aber auch an der Tatsache, daß keine Methoden genannt werden, mit denen die Einhaltung der Grenzwerte zu überprüfen ist. Eine solche Angabe wäre vor allem deswegen wünschenswert, da hinsichtlich der "Fäkalcoliformen" bzw. *E. coli* die Bereiche zwischen Toleranzwert (m) und absolutem Grenzwert (M) sehr eng gefaßt sind (siehe Tab. 18 und 19) und eine Quantifizierung somit diffizile Analyseverfahren erfordert. Die konventionellen Untersuchungstechniken (ISO etc., siehe Tab. 5 und 6) sind aufgrund des hohen Zeit- und Materialaufwandes für Routinezwecke nur bedingt geeignet. Es sollte daher in der vorliegenden Arbeit an Weich- und Schnittkäse, pasteurisierter Milch sowie Säuglings- und Kleinkindernahrung auf Trockenmilchbasis die Brauchbarkeit einer verkürzten Most-Probable-Number-Technik (in Anlehnung an ISO/DIS 7251) und des ursprünglich von ANDERSON und BAIRD-PARKER (1975) beschriebenen Membran-Agar-Verfahrens bei der Untersuchung auf "präsumtive *E. coli*" bzw. "*E. coli* Biotyp I" (im folgenden kurz als "Fäkalcoliforme" bezeichnet) vergleichend geprüft werden.

Die eingesetzte MPN-Technik beruht auf dem Nachweis der Fähigkeit vieler *E. coli*-Stämme Gas aus Laktose sowie Indol auch bei erhöhten Bebrütungstemperaturen zu bilden. Beim Membranverfahren wird nur das Indolbildungsvermögen, ebenfalls bei erhöhten Bebrütungstemperaturen, zur Identifizierung herangezogen. Das Membranverfahren wurde sowohl im Direktansatz auf dem Selektivmedium als auch nach Vorschalten eines Wiederbelebungs-schrittes auf einem nicht selektiven Nährboden durchgeführt (RAYMAN et al., 1979; HOLBROOK et al., 1980). Im Fall von Säuglings- und Kleinkindernahrung erfolgte außerdem eine Wiederbelebungs geschädigter Keime in der Anschüttelung (siehe Abb. 2,3).

4.1 Einfluß der Wiederbelebung auf den Nachweis von "Fäkalcoliformen" und Vergleich von MPN-Technik und Membranverfahren

Bei der Untersuchung von 83 Proben pasteurisierter Konsummilch erwiesen sich MPN-Technik und Membranverfahren als gleichwertig. "Fäkalcoliforme" konnten mit beiden Methoden in keiner Probe nachgewiesen werden.

Bei 94 Proben Säuglings- und Kleinkindernahrung wurden mit beiden Verfahren nur aus zwei Proben "Fäkalcoliforme" isoliert (Tab. 12). Während die MPN-Technik, bedingt durch den Ansatz von nur drei Verdünnungsstufen lediglich die Aussage ">110 Keime/g" zuließ (Probe Nr. 81, mit und ohne Wiederbelebung) bzw. <0,3/g (ohne) und >110/g (mit Wiederbelebung) (Probe Nr. 94), war mit dem Membranverfahren eine Quantifizierung möglich. In beiden Proben wurden nach vierstündiger Wiederbelebung auf dem nichtselektiven Trypton-Soja-Agar (TSA) höhere Keimzahlen gefunden als beim Direktausstrich auf dem selektiven Trypton-Galle-Agar (TBA) bei 44 °C. Bei Direktansatz auf TBA nach vorherigem zweistündigen Stehenlassen der Anschüttelung bei Zimmertemperatur ergab sich in einer Probe ein etwas niedrigerer, in der anderen ein deutlich höherer Keimgehalt als beim Direktansatz. Aufgrund der geringen Zahl an positiven Proben können weitergehende Schlüsse nicht gezogen werden.

Bei den Schnitt- und Weichkäsen war aufgrund des höheren Prozentsatzes an positiven Proben sowohl ein Vergleich zwischen der Effizienz der MPN-Technik gegenüber dem Membranverfahren ohne Wiederbelebung, als auch zwischen dem Membranverfahren mit gegenüber dem ohne Wiederbelebungsschritt möglich. Ein Vergleich zwischen MPN-Technik und dem Membranverfahren mit Resus-zitation erschien nicht sinnvoll, da der zusätzliche Wiederbelebungsschritt beim Membranverfahren die Aussagekraft einer solchen Gegenüberstellung wesentlich einschränkt.

Bei der Untersuchung von 76 Schnittkäseproben fanden sich mit der MPN-Technik in 25 Proben "Fäkalcoliforme", davon enthielten

7 weniger als 10 Keime/g. Mit dem Membranverfahren ohne Wiederbelebung waren 18, mit Wiederbelebung 23 Proben positiv (Tab. 13, Abb. 4). Die Wiederbelebung erbrachte beim Membranverfahren für 18 Proben höhere, aber nur für 5 Proben niedrigere Keimgehalte als der Direktansatz (Tab. 14). Bei 10 Proben überstieg die mit Wiederbelebung ermittelte "Fäkalcoliformen"-Zahl die beim Direktansatz gefundene um mindestens eine Zehnerpotenz. Der umgekehrte Fall trat nur bei 2 Proben auf (Abb. 5). Der Wiederbelebungsschritt führte also bei Schnittkäse in der Regel zum Nachweis höherer Keimzahlen als der Direktansatz, auch wenn sich die geometrischen Mittelwerte nicht signifikant unterschieden ($\bar{x}_g = 38$ Keime/g beim Direktansatz, $\bar{x}_g = 55$ Keime/g bei vorheriger Wiederbelebung).

Die MPN-Technik erbrachte bei 11 Proben höhere und bei 15 Proben niedrigere Keimgehalte/g als das Membranverfahren ohne Wiederbelebung (Tab. 14). Bei 6 Proben lieferte dabei die MPN-Technik um mindestens eine Zehnerpotenz höhere Keimgehalte/g als das Membranverfahren ohne Wiederbelebung (Abb. 6). Der deutlichste Unterschied bestand in diesem Fall in der Zahl der Proben, in denen sich mit beiden Verfahren "Fäkalcoliforme" nachweisen ließen, nämlich 18 Proben beim Membranverfahren ohne Wiederbelebung im Gegensatz zu 25 bei der MPN-Technik (Tab. 13).

Bei der Untersuchung von 103 Weichkäseproben wurden mit der MPN-Technik in 72 Proben, von denen 18 weniger als 10 Keime/g enthielten, mit dem Membranverfahren ohne Wiederbelebung in 50, mit Wiederbelebung in 59 Proben "Fäkalcoliforme" nachgewiesen (Tab. 15, Abb. 7).

Das Membranverfahren mit Wiederbelebung resultierte bei 43 Proben in höheren, bei 16 Proben in niedrigeren Keimgehalten als der Direktansatz (Tab. 17). Bei 18 Proben ergab dabei das Membranverfahren mit Wiederbelebung um mindestens eine Zehnerpotenz höhere Keimzahlen als der Direktansatz, während der umgekehrte Fall nur bei 2 Proben auftrat (Abb. 8). Diese

Werte bestätigen den bereits bei Schnittkäse beobachteten positiven Einfluß der Wiederbelebung auf die Höhe der Keimzahlen. Trotzdem unterschieden sich auch hier die geometrischen Mittelwerte nicht signifikant voneinander ($\bar{x}_g = 36$ Keime/g beim Direktansatz, $\bar{x}_g = 76$ Keime/g bei vorheriger Wiederbelebung) (Tab. 15). Hinsichtlich der Keimzahlen lieferte die MPN-Technik bei 43 Proben höhere und bei 32 Proben niedrigere "Fäkalcoliformen"-Gehalte als das Membranverfahren ohne Wiederbelebung (Tab. 17). Dabei erbrachte die MPN-Technik bei 11 Proben um mindestens eine Zehnerpotenz höhere und bei 13 Proben um mindestens eine Zehnerpotenz niedrigere Keimgehalte als das Membranverfahren ohne Wiederbelebung (Abb. 9).

Die in den eigenen Untersuchungen registrierte Tendenz zu höheren Keimzahlen an E. coli Biotyp I nach Einschalten eines Wiederbelebungsschrittes in den Untersuchungsgang mit dem Membranverfahren beobachteten auch RAYMAN et al. (1979) und HOLBROOK et al. (1980) bei der Untersuchung verschiedener gefrorener, getrockneter, hitzebehandelter und saurer Lebensmittel. Die Effektivität der Wiederbelebung war dabei abhängig von der Art der Streßfaktoren, denen die Keime vor der Untersuchung ausgesetzt gewesen waren, der Höhe der Bebrütungstemperatur, der Zeitdauer der Wiederbelebung, sowie von den zur Wiederbelebung verwendeten Nährböden. Die höchsten Keimzahlsteigerungen waren bei durch Trocknung geschädigten Keimen festgestellt worden.

Faßt man die Ergebnisse des Vergleichs zwischen Membranverfahren ohne Wiederbelebung und MPN-Technik zusammen, so erscheint als auffälligster Unterschied zwischen beiden Methoden die höhere Zahl "Fäkalcoliformen"-positiver Proben, die mit der MPN-Technik aufgrund der niedrigeren unteren Nachweisgrenze festgestellt wurde. Die geometrischen Mittelwerte der mit beiden Verfahren ermittelten "Fäkalcoliformen"-Gehalte in Schnitt- und Weichkäseproben unterschieden sich dagegen kaum voneinander. Zu ähnlichen Resultaten waren auch ANDERSON und

BAIRD-PARKER (1975) beim Vergleich zwischen den in 248 Proben von Fleischprodukten mit Hilfe einer der in den eigenen Untersuchungen eingesetzten vergleichbaren Technik und des Membranverfahrens ohne Wiederbelebung ermittelten Keimzahlen gekommen. Allerdings entgingen methodenbedingt bei der MPN-Technik Proben mit anaerogenen *E. coli* dem Nachweis.

In Untersuchungen an künstlich kontaminierten Parmesankäsen registrierten dagegen SHARPE et al. (1983) mit dem Membranverfahren signifikant höhere Werte als mit der MPN-Technik. In den Untersuchungsgang war allerdings ein Wiederbelebungsschritt eingeschaltet.

Da wie eingangs bereits ausgeführt eine Angabe zur Nachweismethodik bei den kanadischen Probennahmeplänen (Tab. 18 und 19) fehlt, wurden in Tab. 20 die Zahl der mit der MPN-Technik und die Zahl der mit dem Membranverfahren zu beanstandenden Proben aus den eigenen Untersuchungen gegenübergestellt. Als Kriterium wurde dabei nur der Grenzwert M herangezogen. Da die Probenpläne die Prüfung von jeweils 5 Proben aus einer Charge vorsehen, konnten die aufgrund einer Überschreitung von m durch mehr als 2 Proben (c) vorzunehmenden Beanstandungen nicht berücksichtigt werden. Ebenfalls unberücksichtigt blieben diejenigen Weich- und Schnittkäseproben, die aus Rohmilch produziert worden waren, da bei ihnen keine wesentlichen Differenzen zwischen den Verfahren hinsichtlich der Zahl an Beanstandungen zu registrieren waren. Wie aus Tab. 20 hervorgeht, wird die Menge der beanstandeten Weichkäse bei Anwendung des Standards der Health Protection Branch 1983 ($M = 2000$) von der Art der Nachweistechnik nicht betroffen. Bei Anlegen des niedrigeren Grenzwertes ($M = 500$) waren dagegen mit dem Membranverfahren (einschließlich Wiederbelebungsschritt) mehr Proben zu maßregeln. Bei Schnittkäse erbrachte dagegen grundsätzlich das Membranverfahren mit Wiederbelebung die höchste Zahl an Beanstandungen. Bei Untersuchungen mit einem vorgegebenen Grenzwert ist demnach neben diesem auch die Art des Probenmaterials zu berücksichtigen.

Tabelle 20: Zahl der Beanstandungen aufgrund von "Fäkal-coliformen"-Zahlen > M entsprechend den kanadischen Normenvorschlägen (Käse aus pasteurisierter Milch)

Normenvorschlag	Schnittkäse (n = 76)			Weichkäse (n = 103)		
	KT	MV+	MV-	KT	MV+	MV-
COLLINS-THOMPSON et al. (1977) (Tab. 18) M = 500/g	3	6	6	20	25	19
Health Protection Branch, Ottawa (1983) (Tab. 19) M = 2000/g	0	4	2	16	16	16

KT = MPN-Technik (Kurztest)

MV+ = Membranverfahren mit Wiederbelebung

MV- = Membranverfahren ohne Wiederbelebung

Im Schrifttum finden sich einige Angaben zu den Vor- und Nachteilen von MPN-Technik bzw. Membranverfahren (siehe auch Seite 21), die in Tab. 21 zusammengefaßt sind. Die von MEHLMAN und WENTZ (1984) festgestellten Nachteile des Membranverfahrens konnten zum Teil in den eigenen Untersuchungen bestätigt werden. Die langsame Temperaturangleichung, die in falsch-positiven Resultaten resultieren kann, wurde durch Bebrütung der Agar-Platten in Kunststoffbeuteln im Wasserbad beschleunigt (3.2.3), ein Verfahren, das auch von MEHLMAN und WENTZ (1984) vorgeschlagen wird. Nachteilig dabei sind die umständliche Handhabung, der Bedarf an voluminösen Wasserbädern bei großen Probenzahlen, sowie die Gefahr von Undichtigkeiten der

Tabelle 21: Vergleich zwischen MPN-Technik und Membranverfahren - Vorteile und Nachteile beider Methoden

MPN-Technik	Membranverfahren
<u>Vorteile:</u>	<u>Vorteile:</u>
1. In niedrigen Keimzahlbereichen genauer	1. In höheren Keimzahlbereichen genauer
2. preiswert (ca. 3,50 DM für 1 Probe Weichkäse)	2. geringere Variabilität der Keimzahlen ²⁾
	3. Erfasst auch Laktose-negative Keime
	4. Schnelle Durchführung (ca. 24 h)
<u>Nachteile:</u>	<u>Nachteile:</u>
1. In höheren Keimzahlbereichen ungenauer	1. In niedrigen Keimzahlbereichen ungenauer
2. Anaerogene E. coli werden nicht erfasst ¹⁾	2. Indol-Reagenz tötet Keime ab, daher keine weitere Kultivierung und Differenzierung möglich ¹⁾
3. Zeitaufwendig (3-6 Tage)	3. Geringere Wiederfindungsrate mit variierenden Keimzahlen ³⁾
	4. Interferenz mit Aeromonas hydrophila und Enterobacter agglomerans
	5. Probleme mit der Auswertung, wenn hohe Zahlen an Enterobacteriaceae im Material präsent sind ²⁾
	6. Hintergrundinterferenz mit Lebensmittelpartikeln ³⁾
	7. Langsame Temperaturangleichung ³⁾
	8. teuer (ca. 17,50 DM für 1 Probe Weichkäse) ⁴⁾

1) ANDERSON und BAIRD-PARKER (1975)

2) SHARPE et al. (1983)

3) MEHLMAN und WENTZ (1984)

4) siehe 3.2.3, Parallelansatz

Kunststoffbeutel. Letzteres kam bei den eigenen Untersuchungen einige Male vor. Die von MEHLMAN und WENTZ (1984) kritisierte Hintergrundinterferenz von Lebensmittelpartikeln konnte bei der Untersuchung von Säuglings- und Kleinkindernahrung bestätigt werden. Der Vorschlag beider Autoren, das Homogenisat zu filtrieren und zu zentrifugieren, würde allerdings zu erheblichem zusätzlichen Kosten-, Material- und Arbeitsaufwand führen. Das gleiche gilt für die Empfehlungen von MEHLMAN und WENTZ (1984), für jede Probe 10 Platten anzusetzen und mit Hilfe von ein bis zwei Bestätigungsreaktionen, z.B. Oxidase- und Voges-Proskauer-Test, die Interferenz von anderen Keimen zu minimieren. Der Voges-Proskauer-Test beispielsweise nimmt zusätzliche 48 h in Anspruch (EDWARDS und EWING, 1972) und dehnt damit die Zeitdauer der Untersuchung mit Hilfe des Membranverfahrens auf drei Tage aus, womit der Zeitvorteil der ursprünglich als 24 h-Test konzipierten Methode gegenüber der MPN-Technik nahezu aufgehoben würde. Der sicherlich größte Nachteil des Membranverfahrens liegt in den hohen Kosten für die Membranen, von denen zur Zeit eine ca. 1,45 DM kostet. Wenn, wie in den eigenen Untersuchungen, zur Zählung von *E. coli* Biotyp I in Käse fünf Verdünnungen anzusetzen sind, werden beim üblichen Parallelansatz 10 Membranen verbraucht und die Kosten belaufen sich auf ca. 17,50 DM. Die gleiche Untersuchung mit der verkürzten MPN-Technik kostet dagegen nur ca. 3,50 DM.

4.2 Vergleich zwischen konventionellem und verkürztem MPN-Verfahren

Der Nachweis von "Fäkalcoliformen" bzw. präsumtiven *E. coli* (siehe Tab. 5 und 6) mittels MPN-Technik erfolgt in der Regel in drei Schritten (im folgenden als Langtest bezeichnet):

1. Beimpfung eines flüssigen Selektivmediums und Bebrütung über 24-48 h bei 35-37 °C.
2. Überimpfen von Material aus Röhrchen, die Gasbildung zeigen, in ein flüssiges Selektivmedium und Bebrütung über 24-48 h bei 44-46 °C.

3. Überimpfen von Material aus Röhrchen, die Gasbildung zeigen, in ein tryptophanhaltiges Medium, Bebrütung über 24-48 h bei 44-46 °C und Nachweis der Indolbildung.

Der erste Schritt wird für notwendig gehalten, um den direkten Einfluß der erhöhten Bebrütungstemperaturen auf eventuell geschädigte Keime zu vermeiden. Die Dauer des Untersuchungsganges wird damit um bis zu 48 h verlängert. In den eigenen Versuchen sollte geprüft werden, ob ein verkürztes MPN-Verfahren (im folgenden als Kurztest bezeichnet) unter Umgehung der "Wiederbelebung" eine für Routineuntersuchungen noch akzeptable Sicherheit aufweist. Zu diesem Zwecke wurden die eigenen, mit dem Kurztest (3.2.2) ermittelten Resultate mit den Ergebnissen von DIEPOLDER (1985) verglichen, der im selben Zeitraum parallel die identischen Proben mit einem Langtest untersuchte, der wie folgt ablief:

1. Beimpfung von Brillantgrün-Galle-Laktose-Bouillon (BGLB) in Form der MPN-Technik und 48 h Bebrütung bei 30 °C.
2. Aus Röhrchen mit Gasbildung Beimpfung von BGLB sowie Tryptonwasser (TW) und 48 h Bebrütung bei 44 °C.

Das weitere Vorgehen entsprach demjenigen der eigenen Versuche (3.2.2).

Bei der Untersuchung der 83 Proben pasteurisierter Konsummilch waren weder mit dem Kurz- noch mit dem Langtest "Fäkalcoliforme" nachzuweisen. Bei der Untersuchung von 94 Proben Säuglings- und Kleinkindernahrung konnten mit dem Kurztest ohne Wiederbelebung in der Anschüttelung in einer, nach Wiederbelebung in der Anschüttelung in zwei Proben "Fäkalcoliforme" nachgewiesen werden (Tab. 12). Dieselben Resultate lieferte der Langtest, mit dem ohne Wiederbelebung nur in einer, nach Wiederbelebung zusätzlich in einer weiteren, zuvor negativen Probe "Fäkalcoliforme" jeweils in Zahlen von über 100/g festgestellt wurden.

In Tab. 22 werden die hinsichtlich ihrer mit dem Kurz- bzw. Langtest in Schnitt- und Weichkäse erzielten Befunde zusammengefaßt. Aus 25 (32,9 %) Schnitt- (Tab. 13) und 72 (69,9 %) Weichkäseproben (Tab. 15) konnten mit dem Kurztest, aus 31 (40,8 %) Schnitt- und ebenfalls 72 (69,9 %) Weichkäseproben

Tabelle 22: Ergebnisse der Untersuchungen von Weich- und Schnittkäse (Kurz- bzw. Langtest)

Proben	Schnittkäse (n = 76)		Weichkäse (n = 103)	
	KT	LT	KT	LT
Zahl der positiven Proben	25	31	72	72
Zahl der mit beiden Tests negativen Proben	43	43	31	31
Zahl der nur im Langtest positiven Proben	--	8	--	4
Zahl der nur im Kurztest positiven Proben	2	--	4	--

KT = Kurztest

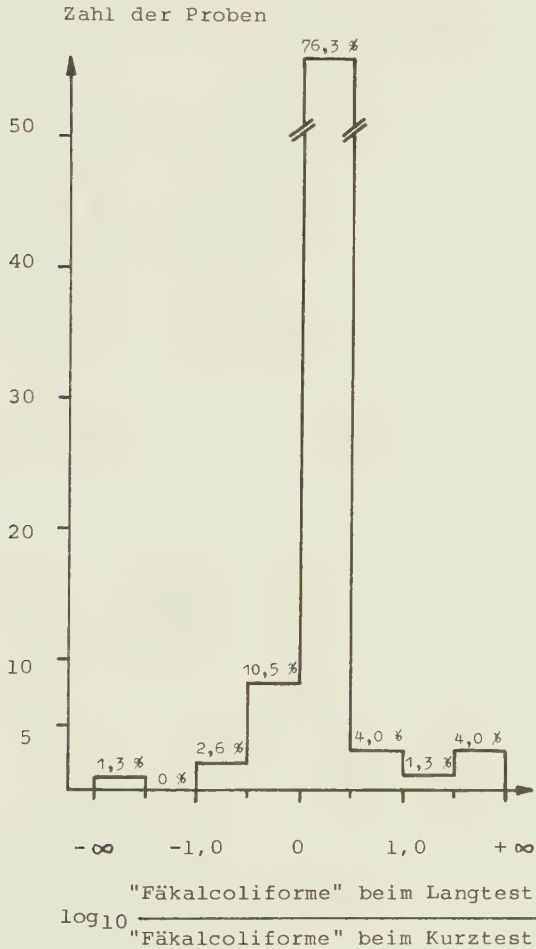
LT = Langtest

mit dem Langtest "Fäkalcoliforme" isoliert werden. Bei Schnittkäse waren in 43 Proben weder mit Kurz- noch mit Langtest "Fäkalcoliforme" nachweisbar. In 8 Proben, bei denen der Kurztest keine "Fäkalcoliformen" nachwies, verlief der Langtest positiv. Bei 7 dieser Proben ergab sich eine höchstwahrscheinliche Keimzahl von 3 bzw. 4/g, bei einer Probe eine solche von 250/g. Nur bei 2 Proben, in denen sich mit dem Langtest keine "Fäkalcoliformen" nachweisen ließen, lieferte der Kurztest mit 4 bzw. 95 Keimen/g positive Resultate. Von den 31 Weichkäseproben, in denen weder mit Kurz- noch mit Langtest "Fäkalcoliforme" gefunden wurden, lieferten bei 27 Proben beide Verfahren Keimgehalte von unter 3/g. In 4 Proben, bei denen der Kurztest keine "Fäkalcoliformen" nachwies, erbrachte der Langtest Keimzahlen von 9/g (bei 3 Proben) bzw. 25/g (bei einer Probe). In 4 weiteren Proben, bei denen der Langtest negativ

verlief, ergab der Kurztest Keimzahlen von 4/g (bei 3 Proben) bzw. 9/g (bei einer Probe). Bei 47 (61,8 %) Schnitt- und 36 (34,9 %) Weichkäseproben lieferten Kurz- und Langtest dieselben "Fäkalcoliformen"-Gehalte. Bei 18 (23,7 %) Schnitt- und 46 (44,7 %) Weichkäseproben lieferte der Kurztest niedrigere, bei 11 (14,5 %) Schnitt- und 21 (20,4 %) Weichkäseproben höhere "Fäkalcoliformen"-Gehalte als der Langtest. Bei Schnittkäse trat zwischen den mit Kurz- bzw. Langtest ermittelten "Fäkalcoliformen"-Gehalten bei 71 (93,4 %) Proben ein Keimzahlunterschied von maximal einer Zehnerpotenz auf (Abb. 10), wobei nach Abzug der 47 (61,8 %) Proben mit gleicher Keimzahl bei 24 (31,6 %) Proben eine tatsächliche Keimzahldifferenz von höchstens einer Zehnerpotenz vorkam. Bei 4 (5,3 %) Proben lieferte der Langtest um mehr als eine Zehnerpotenz höhere, bei einer (1,3 %) Probe um mehr als eine Zehnerpotenz niedrigere Keimgehalte/g als der Kurztest. Die extremsten Werte für die dekadischen Logarithmen der Keimzahlquotienten betrugen + 2,22 bzw. - 1,80. Bei Weichkäse bestand bei 84 (81,6 %) Proben eine Keimzahldifferenz zwischen Kurz- und Langtest von maximal einer Zehnerpotenz (Abb. 11). Nach Abzug von 36 (34,9 %) Proben mit Keimzahlgleichheit ergeben sich 48 (46,6 %) Proben, bei denen sich die mit Kurz- bzw. Langtest gefundenen "Fäkalcoliformen"-Gehalte tatsächlich um mindestens eine Zehnerpotenz unterschieden. Bei 16 (15,5 %) Proben lagen die Ergebnisse des Langtests um mehr als eine Zehnerpotenz über denen des Kurztests, der umgekehrte Fall trat nur bei 3 (2,9 %) Proben auf. Die extremsten Werte für die Logarithmen betrugen hierbei + 3,10 bzw. - 3,74.

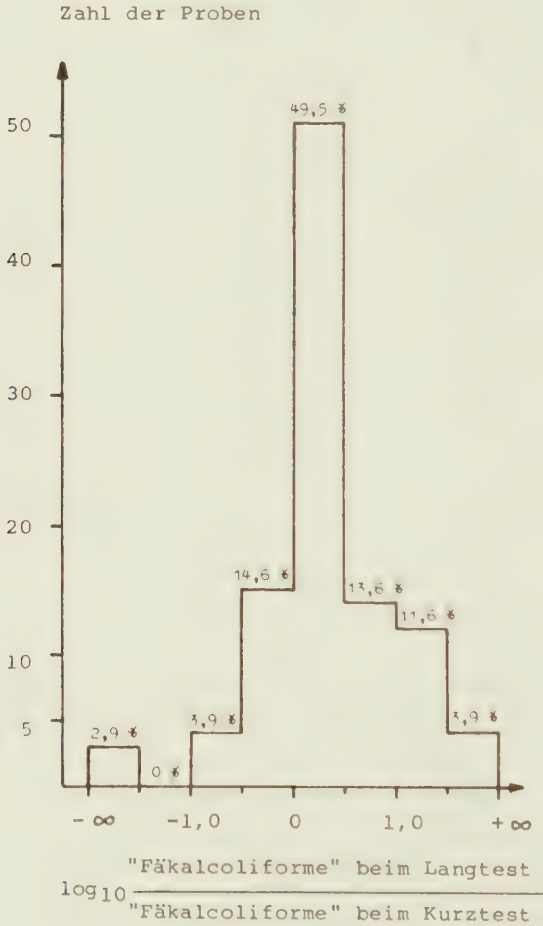
Weder bei Schnitt- noch bei Weichkäse konnte für das geometrische Mittel der höchstwahrscheinlichen "Fäkalcoliformen"-Zahlen ein signifikanter Unterschied zwischen Kurz- und Langtest festgestellt werden, auch wenn letzterer im Durchschnitt geringfügig höhere Keimgehalte erbrachte als der Kurztest ($\bar{x}_g = 3,6$ bzw. $4,5$ Keime/g in Schnittkäse, $\bar{x}_g = 47$ bzw. 87 Keime/g in Weichkäse beim Kurz- bzw. Langtest. Faßt man wie in Tab. 22 die bei der Untersuchung von Weichkäse erzielten

Abbildung 10: Häufigkeitsverteilung der dekadischen Logarithmen von "Fäkalcoliiformen"-Zahlen in 76 Schnittkäseproben bei Bestimmung mit der MPN-Technik - Kurztest bzw. Langtest*



* siehe Abb. 5

Abbildung 11: Häufigkeitsverteilung der dekadischen Logarithmen von "Fäkalcoliformen"-Zahlen in 103 Weichkäse-Proben bei Bestimmung mit der MPN-Technik - Kurztest bzw. Langtest*



* siehe Abb. 5

Resultate zusammen, so ergeben sich für den Langtest hinsichtlich der Zahl an positiven Proben keine Vorteile. In Schnittkäse erbrachte dagegen der Langtest bei 8 Proben, die im Kurztest negativ waren, positive Ergebnisse, wobei allerdings deren Keimzahlen im Bereich der unteren Nachweisgrenze lagen. Zum Zweck von Routineuntersuchungen an Weich- und Schnittkäsen, z.B. bei der werkseigenen Produktkontrolle, kann daher unter Berücksichtigung der Zeitersparnis von 48 h der Kurztest empfohlen werden. Problematischer erscheint dagegen die Beurteilung der Brauchbarkeit des Kurztests, z.B. bei amtlichen Untersuchungen. Legt man die in den Tab. 18 und 19 wiedergegebenen kanadischen Grenzwerte M zugrunde, so ergibt sich für Käse aus pasteurisierter Milch das in Tab. 23 skizzierte Bild. Auf die Darstellung der Verhältnisse bei Käse aus Rohmilch wurde verzichtet, da sich hinsichtlich der Zahl an Beanstandungen keine Unterschiede zwischen Lang- und Kurztest feststellen ließen. Wie aus der Tab. hervorgeht, waren wesentlichere Differenzen nur bei Weichkäsen zu verzeichnen. So wurden für M = 500/g sechs, für M = 2000/g sieben Proben mehr

Tabelle 23: Zahl der Beanstandungen aufgrund von "Fäkalcoliformen"-Zahlen > M entsprechend den kanadischen Normenvorschlägen (Käse aus pasteurisierter Milch)

Normenvorschlag	Schnittkäse (n = 76)		Weichkäse (n = 103)	
	KT	LT	KT	LT
COLLINS-THOMPSON et al. (1977) (Tab. 18) M = 500/g	3	5	20	14
Health Protection Branch, Ottawa, (1983) (Tab. 19) M = 2000/g	0	0	16	9

KT = Kurztest

LT = Langtest

mit dem Kurztest als mit dem Langtest beanstandet, was nach der in Abb. 11 wiedergegebenen Verteilung nicht ohne weiteres zu erwarten gewesen wäre. Das verkürzte Verfahren scheint somit auch bei Untersuchungen mit vorgegebenen Grenzwerten dem Langtest nicht unterlegen zu sein.

4.3 Vorkommen von "Fäkalcoliformen" in den untersuchten Produkten

In diesem letzten Abschnitt sollen die bei den eigenen Untersuchungen in Milch und Milchprodukten ermittelten "Fäkalcoliformen"-Gehalte besprochen und mit den Ergebnissen anderer Untersucher verglichen werden. Zu diesem Zweck konnten nur die mit Hilfe der MPN-Technik gefundenen Werte herangezogen werden, da im Schrifttum keine Berichte über mit dem Membranverfahren durchgeführte Erhebungen an derartigen Lebensmitteln vorlagen.

In keiner von 83 Proben pasteurisierter Konsummilch konnten unabhängig von der Untersuchungsmethodik "Fäkalcoliforme" nachgewiesen werden. PAPA VASSILIOU (1957) fand dagegen in 15 (4,0 %) von 375 und MURRAY (1960) in 165 (2,2 %) von 7432 untersuchten Proben pasteurisierter Milch *E. coli*. Der Grund für die bei den eigenen Untersuchungen festgestellte Freiheit von "Fäkalcoliformen" ist möglicherweise in der saisonalen Abhängigkeit des Vorkommens dieser Keime zu suchen, die von den beiden Autoren belegt wird. So enthielten nur 5 (0,3 %) der 1812 von MURRAY (1960) in den Monaten April und Mai, sowie eine (0,5 %) der von PAPA VASSILIOU (1957) im Zeitraum von Februar bis Mai untersuchten 207 Milchproben *E. coli*. Die eigenen Untersuchungen an Milchproben waren von Ende März bis Mitte Mai 1983 durchgeführt worden, fielen also in eine Jahreszeit, in der offenbar mit geringeren *E. coli*-Gehalten zu rechnen ist als während der Sommermonate. Außerdem war die Probenzahl geringer als bei den genannten Untersuchern, so daß die Unterschiede auch hierdurch erklärt werden können.

Nur in einer von 94 Säuglings- und Kleinkindernahrungen fanden sich in den eigenen Untersuchungen mit der MPN-Technik (ohne Wiederbelebung in der Anschüttelung) "Fäkalcoliforme" (Tab. 12). Dies entspricht etwa den 1982 von SCHWAB et al. aus den USA berichteten Ergebnissen von Untersuchungen an 1574 Trockenmilchpräparaten, die alle negativ verliefen. Ähnliche Angaben für die Bundesrepublik Deutschland finden sich bei FROMM und STRAHTMANN (1980) (von 22 Proben eine positiv). Lediglich in einer älteren Arbeit aus der DDR (SCHÖNHERR, 1962) wurden bei der Untersuchung von Trockenmilchpräparaten aus 18,6 % der Proben E. coli in durchschnittlichen Zahlen von $1,5 \times 10^3$ /ml des rekonstituierten Materials isoliert. Hinsichtlich einer Belastung mit E. coli sind somit Säuglings- und Kleinkindernahrungen auf Trockenmilchbasis zur Zeit als unbedenklich einzustufen.

In 32,9 % der Schnittkäseproben wurden "Fäkalcoliforme" nachgewiesen (Tab. 13), wobei Höchstwerte im Bereich von 10^3 /g auftraten. GRIEM (1982) fand dagegen in 81,9 % der von ihr ebenfalls in der Bundesrepublik geprüften Schnittkäseproben E. coli. Trotz dieser bei vergleichbarer Untersuchungstechnik wesentlich höheren Zahl an positiven Proben lagen die Mittelwerte aus beiden Untersuchungen sehr eng beieinander. Auch Berichte aus anderen Ländern wie Südamerika (LÜCK und DUNKELD, 1981) und Argentinien (TESONE et al., 1981) sprechen dafür, daß ein relativ hoher Prozentsatz der Schnittkäse "Fäkalcoliforme" bzw. E. coli enthält, wobei Werte im Bereich von 10^3 - 10^4 /g in der Regel nicht überschritten werden.

Bei den untersuchten Weichkäseproben fand sich ein wesentlich höherer mit "Fäkalcoliformen" kontaminierter Anteil von 69,9 % mit Höchstwerten im Bereich von 10^5 /g (Tab. 15). Einen Vergleich zwischen der bei den eigenen Untersuchungen ermittelten Verteilung auf verschiedene Keimgehaltsbereiche mit den Ergebnissen anderer Untersucher zeigt Tab. 24. Während die eigenen Ergebnisse weitgehende Übereinstimmung mit denen von FRANK und MARTH (1978) (USA) zeigen, fanden TESONE und QUEVEDO (1978) (Argentinien) nur einen geringen Prozentsatz mit

Tabelle 24: Prozentuale Verteilung der "Fäkalcoliformen"-
Gehalte von Weichkäseproben auf verschiedene
Keimgehaltsbereiche

Keimgehalt pro g	Eigene Untersuchungen (n = 103)	FRANK und MARTH (1978)* (n = 106)	TESONE und QUEVEDO (1978) (n = 117)
< 10	47,6 %	41,5 %	3,4 %
10 - < 10 ²	19,4 %	16,0 %	22,2 %
10 ² - < 10 ³	9,7 %	14,2 %	25,7 %
10 ³ - < 10 ⁴	10,7 %	11,3 %	16,2 %
≥ 10 ⁴	12,6 %	17,0 %	32,5 %

* hier wurde jeweils die obere Grenze zur Klasse hinzugenommen

"Fäkalcoliformen"-Gehalten unter 10/g, hingegen deutlich höhere Prozentsätze in Bereichen von mehr als 10²/g. Auch andere, an einzelnen Weichkäsesorten wie Camembert durchgeführte Erhebungen lassen auf eine relativ häufige und hohe Belastung dieser Produkte mit "Fäkalcoliformen" bzw. E. coli schließen (BLÜMEL, 1975; FRANK und MARTH, 1978; TOLLE et al., 1980; GRIEM, 1982; FRANKE und LINGEN, 1983; SONNENMOSER und KESSLER, 1984), die die Kontamination von Schnittkäse deutlich übertrifft (Tab. 13 und 15). Es erscheint daher fraglich, ob nicht anstelle des von COLLINS-THOMPSON et al. (1977) bzw. der Health Protection Branch (Tab. 18 und 19) für alle Käsegruppen einheitlichen Vorschläge einer Keimzahllimitierung besser getrennte Probenpläne für die verschiedenen Käsegruppen erstellt würden.

Bezüglich der im übrigen nicht signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Keimgehalte zwischen Weichkäse mit Schmiere- bzw. Schimmelbildung sowie der nur mit dem Membranverfahren mit Wiederbelebung signifikant höheren Keimzahlen in deutschen gegenüber ausländischen Produkten wird auf den Ergebnisteil (S. 45) verwiesen.

5. Zusammenfassung

Milch und Milchprodukte wurden mit einer verkürzten Most-Probable-Number-Technik und einem Membran-Agar-Verfahren mit und ohne Wiederbelebung auf ihren Gehalt an "Fäkalcoliformen" bzw. *Escherichia (E.) coli* Biotyp I untersucht. Beim Membranverfahren führte die Wiederbelebung in der Regel zum Nachweis höherer Zahlen an *E. coli* Biotyp I als der Direktansatz. Zwischen den Mittelwerten der mit beiden Verfahren gefundenen Keimzahlen bestanden allerdings keine signifikanten Unterschiede. Mit der verkürzten MPN-Technik ließen sich, bedingt durch die höhere Empfindlichkeit, zwar häufiger "Fäkalcoliforme" nachweisen als mit dem vergleichbaren Membranverfahren ohne Wiederbelebung, die Mittelwerte der Keimzahlen unterschieden sich jedoch ebenfalls nicht signifikant. Beide Verfahren können zumindest für Routineuntersuchungen empfohlen werden. Als wesentlicher Nachteil der MPN-Technik ist die lange Dauer (3-4 Tage), beim Membranverfahren der hohe Kostenaufwand anzusehen.

In keiner der Milch- und nur in zwei Proben Säuglings- und Kleinkindernahrung konnten "Fäkalcoliforme" bzw. *E. coli* Biotyp I nachgewiesen werden. Bei Schnittkäse wurden maximale Gehalte im Bereich von 10^4 bis 10^5 /g festgestellt. In aus wärmebehandelter Milch hergestellten Schnittkäsen konnten die Keime etwas häufiger gefunden werden als in den aus roher Milch erzeugten. Bei Weichkäse lagen die höchsten Gehalte im Bereich von 10^5 bis 10^6 /g. Proben mit weniger als 10^3 Keimen/g waren bei Weichkäse mit Schimmel seltener als bei solchen mit Schmiere. Für Keimzahlen über 10^3 /g traf das Gegenteil zu. Signifikante Unterschiede ergaben sich dabei nicht. In inländischen Weichkäsen wurden höhere "Fäkalcoliformen"-Gehalte registriert als in ausländischen. Die Unterschiede waren aber nur für das Membranverfahren mit Wiederbelebung signifikant.

Summary

Comparison of MPN-technique and direct membrane-plating method for the enumeration of "fecal coliforms" in milk and dairy products

Milk and dairy products were examined for their content of "fecal coliforms" and *Escherichia* (E.) coli biotype I, respectively, by a shortened most-probable-number-technique and a direct membrane-plating method with and without resuscitation step. Using direct plating resuscitation as a rule yielded higher numbers of E. coli biotype I, there were no significant differences between the mean values of numbers of E. coli reached with both techniques. Due to the higher sensibility, "fecal coliforms" were detected more often by the shortened MPN-technique than by comparable direct plating without resuscitation. The mean values however, did not differ significantly, too. From the results of this study MPN-technique and direct membrane-plating can be recommended at least for routine examinations of milk and milk products. Disadvantage of the MPN-technique seems to be the time of 3-4 days until results are available. On the other hand the membranes used for direct plating are very expensive.

In none of the samples of pasteurized milk, and only in two samples of infant food "fecal coliforms" or E. coli biotype I could be detected. Semi-soft cheese contained maximal numbers in the range of 10^4 to 10^5 /g. In semi-soft cheese produced from heat treated milk the microorganisms could be detected more often than in cheese produced from raw milk. In soft cheese highest numbers were in the range of 10^5 to 10^6 /g. Samples with less than 10^3 microorganisms/g were less frequent in mould-ripened cheese than in smear cheese. For numbers exceeding 10^3 /g the opposite was true but differences were not significant. In German soft cheese higher numbers of "fecal coliforms" were found than in soft cheese from foreign countries. These differences were only significant using direct plating method with resuscitation step.

6. Literaturverzeichnis

ANDERSON, J.M. und A.C. BAIRD-PARKER (1975):

A rapid and direct plate method for enumerating *Escherichia coli* biotype I in food.

J. appl. Bact. 39, 111-117.

AOAC (Association of Official Analytical Chemists) (1980):

Official Methods of Analysis of the AOAC

13th ed., p. 825-826.

APHA (American Public Health Association) (1972):

Standard methods for the examination of dairy products.

13th ed., p. 88-99.

American Public Health Association, Washington, D.C.

APHA (American Public Health Association) (1976):

Compendium of methods for the microbiological examination of foods, p. 277-287.

American Public Health Association, Washington, D.C.

APHA et al. (American Public Health Association - American Water Works Association - Water Pollution Control Federation) (1976):

Standard methods for the examination of water and wastewater.

14th ed., p. 913-915.

American Public Health Association, Washington, D.C.

AUSTIN, B., D. HUSSONG, R.M. WEINER und R.R. COLWELL (1981):

Numerical taxonomy analysis of bacteria isolated from the completed "most probable numbers" test for coliform bacilli.

J. appl. Bact. 51, 101-112.

BAGLEY, S.T. und R.J. SEIDLER (1977):

Significance of fecal coliform-positive *Klebsiella*.

Appl. Environ. Microbiol. 33, 1141-1148.

BARDSLEY, D.A. (1934):

The distribution and sanitary significance of *B. coli*, *B. lactis aerogenes* and intermediate types of coliform bacilli in water, soil, faeces, and ice-cream.

J. Hyg. 34, 38-68.

BEGGS, W.H. und H.C. LICHSTEIN (1965):

Repression of tryptophanase synthesis in *Escherichia coli*.

J. Bacteriol. 89, 996-1004.

BLACHSTEIN (1893):

Contribution à l'étude microbique de l'eau.

Ann. Inst. Pasteur 7, 689-694.

BLAZEVIC, D.J. (1968):

Improved motility-indole medium.

Appl. Microbiol. 16, 668.

BLÜMEL, B. (1975):

Unspezifische Lebensmittelvergiftung durch Camembert - Aspekte der mikrobiologischen Untersuchung innerhalb der amtlichen Lebensmittelüberwachung.

Arch. Lebensmittelhyg. 26, 61-65.

BORNEFF, J. (1957):

Methoden und Ziele der Colitestung.

Arch. Hyg. 141, 505-531.

BREED, R.S. und J.F. NORTON (1937):

Nomenclature for the colon group.

Am. J. Pub. Hlth. 27, 560-563.

BRENNER, D.J. (1984):

Enterobacteriaceae

in: Bergey's manual of systematic bacteriology, 9th ed.,
Vol. 1, p. 408-516.

Williams and Wilkins, Baltimore, London.

BROOKE, M.S. (1951):

The biochemical properties of Klebsiella strains with new
capsular antigens.

Acta. Pathol. Microbiol. Scand. 28, 328-337.

BROWN, C. und R.J. SEIDLER (1973):

Potential pathogens in the environment: Klebsiella pneumoniae,
a taxonomic and ecological enigma.

Appl. Microbiol. 25, 900-904.

BUCHBINDER, L. und E.C. ALFF (1947):

Studies on coliform organisms in dairy products. The practical
significance of so-called heat resistant coliform organisms in
the coliform testing of pasteurized milk.

J. Milk Food Technol. 10, 137-148.

BULLING, E. (1965):

Beiträge zur Salmonella-Diagnostik. I. Mitteilung. Die
biochemische Differenzierung der Enterobacteriaceae.

Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 78, 52-56.

BUSTA, F.F. (1975):

Practical implications of injured microorganisms in food.

J. Milk Food Technol. 39, 138-145.

CLOSS, O. und A. DIGRANES (1971):

Rapid identification of prompt lactose-fermenting genera
within the family Enterobacteriaceae.

Acta Path. Microbiol. Scand. Section B. 79, 673-678.

COLLINS-THOMPSON, D.L., I.E. ERDMANN, M.E. MILLING, D.M.
BURGENER, U.T. PURVIS, A. LOIT und R.M. COULTER (1977):
Microbiological standards for cheese: survey and viewpoint of
the Canadian Health Protection Branch.
J. Food Prot. 40, 411-414.

DARRELL, J.H. und A.D.F. HURDLE (1964):
Identification and clinical significance of Klebsiella species
in chest infections.
J. clin. Path. 17, 617-621.

DAVIS, T.J. und J.M. MATSEN (1974):
Prevalence and characteristics of Klebsiella species: relation
to association with a hospital environment.
J. Infect. Dis. 130, 402-405.

DELANEY, J.E., J.A. MCCARTHY und R.J. GRASSO (1962):
Measurement of E. coli type I by the membrane filter.
Water and Sewage Works 109, 289-294.

DIEPOLDER, H. (1985):
In Vorbereitung
Diss med. vet. München

DOMMETT, T.W. (1975):
Coliform types isolated from Queensland cheddar cheese.
Austr. J. Dairy Technol. 30, 38-41.

DUNCAN, D.W. und W.E. RAZZELL (1972):
Klebsiella biotypes among coliforms isolated from forest
environments and farm produce.
Appl. Microbiol. 24, 933-938.

EDWARDS, P.R. und M.A. FIFE (1952):
Capsule types of Klebsiella.
J. Infect. Dis. 91, 92-104.

DIESELBEN (1955):

Studies on the Klebsiella-aerobacter-group of bacteria.
J. Bacteriol. 70, 382-390.

EDWARDS, P.R. und W.H. EWING (1972):

Identification of Enterobacteriaceae.
Burgess Publishing Company, Minneapolis.

EICKHOFF, T.C., B.W. STEINHAUER und M. FINLAND (1966):

The Klebsiella-Enterobacter-Serratia division. Biochemical und
serologic characteristics and susceptibility to antibiotics.
Ann. Intern. Med. 65, 1163-1179.

EIJKMAN, C. (1904):

Die Gärungsprobe bei 46 °C als Hilfsmittel bei der
Trinkwasseruntersuchung.
Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. 37, 742-752.

ERGÜLLÜ, E. (1983):

Zur Differenzierung laktosespaltender Enterobacteriaceen aus
Milch und Milchprodukten.
Dtsch. MolK.-Ztg. 104, 518-624.

FANTASIA, L.D., L. MESTRANDREA, J.P. SCHRADE und J. YAGER

(1975): Detection and growth of enteropathogenic Escherichia
coli in soft ripened cheese.
Appl. Microbiol. 29, 179-185.

FARMER III, J.J., B.R. DAVIS, F.W. HICKMAN-BRENNER, A.

McWHORTER, G.P. HUNTLEY-CARTER, M.A. ASBURY, C. RIDDLE, H.G.
WATHEN-GRADY, C. ELIAS, G.R. FANNING, A.G. STEIGERWALT, C.M.
O'HARA, G.K. MORRIS, P.B. SMITH und D.J. BRENNER (1985):
Biochemical identification of new species and biogroups of
Enterobacteriaceae isolated from clinical specimens.
J. Clin. Microbiol. 21, 46-76.

FISHBEIN, M. (1962):

The aerogenic response of *Escherichia coli* and strains of *Aerobacter* in EC broth and selected sugar broths at elevated temperatures.

Appl. Microbiol. 10, 79-85.

FRANK, J.F. und E.H. MARTH (1978):

Survey of soft and semisoft cheese for presence of fecal coliforms and serotypes of enteropathogenic *Escherichia coli*.
J. Food Protec. 41, 198-200.

FRANKE, V. (1982):

Zur Identifizierung von Enterotoxin-bildenden *E. coli*-Stämmen aus Milch und Milchprodukten.

Diss. med. vet. München.

FRANKE, V. und S. LINGEN (1983):

Zum Vorkommen von pathogenen Enterobacteriaceen in Camembert.
Arbeitstagung 1983 der Deutschen Gesellschaft für Milchwissenschaft, Freising-Weihenstephan, 13.-14. September.
1983

Molk.-Ztg. 37, 1529.

FROMM, G. und U. STRAHTMANN (1970):

Keimgehalte von Säuglings- und Kleinkindernahrungen, Stärkungsmitteln und Tiefkühlgemüsen - eine Vergleichsuntersuchung.

Dt. Lebensm.-Rdsch. 66, 1-6.

GRABOW, W.O.K., C.A. HILNER und P. COUBROUGH (1981):

Evaluation of standard and modified M-FC, MacConkey, and Teepol media for membrane filtration counting of fecal coliforms in water.

Appl. Environ. Microbiol. 42, 192-199.

VON GREAVENITZ, A. und R. SCHOENTAG (1968):

The diagnosis of rapid lactose-fermenting gramnegative rods in the hospital laboratory.

Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. 209, 31-36.

GRIEM, E. (1982):

Die Enterobacterienflora von Käse.

Diss. oec. troph. Weihenstephan.

HALLS, S. und P.A. AYRES (1974):

A membrane filtration technique for the enumeration of *Escherichia coli* in seawater.

J. appl. Bact. 37, 105-109.

HARRIGAN, W.F. und M.E. McCANCE (1976):

Laboratory methods in food and dairy microbiology, p. 139-144.

Academic Press, London - New York - San Francisco.

HELLMANN, E. (1969):

Ergebnisse der Differenzierung von Enterobacteriaceen aus Milch.

Arch. Lebensmittelhyg. 20, 241-246.

HENRIKSEN, S.D. (1954a):

Studies on the *Klebsiella* group (Kauffmann).

Acta Pathol. Microbiol. Scand. 34, 259-265.

DERSELBE (1954b):

Comparison of coliform organisms from feces and from water in Norway.

Acta Pathol. Microbiol. Scand. 35, 75-90.

DERSELBE (1955):

A study of the causes of discordant results of the presumptive and completed coliform tests on Norwegian waters.

Acta Pathol. Microbiol. Scand. 36, 87-95.

HOLBROOK, R., J.M. ANDERSON und A.C. BAIRD-PARKER (1980):
Modified direct plate method for counting *Escherichia coli* in
foods.

Food Technol. Austr. 32, 78-83.

HOLBROOK, R., und J.M. ANDERSON (1982):

The rapid enumeration of *Escherichia coli* in foods by using a
direct plating method.

in: CORRY, J.E.L., D. ROBERTS und F.A. SHIMER, Isolation and
identification methods for fecal poisoning organisms, p. 239-
254.

Society for applied bacteriology, Technical series 17, London,
Academic press.

HURST, A. (1977):

Bacterial injury: a review.

Can. J. Microbiol. 23, 935-944.

ICMSF (1978):

Microorganisms in foods: I. Their significance and methods of
enumeration.

University of Toronto Press, Toronto und Buffalo.

INGRAM, M. (1977):

zit. n.: MOSSEL, D.A.A., P.G.H. BIJKER und I. EELDERINK

(1978): Streptokokken der Lancefield-Gruppe D in Lebensmitteln
und Trinkwasser - ihre Bedeutung, Erfassung und Bekämpfung.

Arch. Lebensmittelhyg. 29, 121-127.

ISENBERG, H.D. und B.G. PAINTER (1971):

Comparison of conventional methods, the R/B system, and
modified R/B system as guides to the major divisions of
Enterobacteriaceae.

Appl. Microbiol. 22, 1126-1134.

- ISO/DIS 7251 (International Organization for Standardization/
Draft International Standard) (1983):
Microbiology - General guidance for enumeration of presumptive
Escherichia coli.
- KABLER, P.W. und H.F. CLARK (1966):
Coliform group and fecal coliform organisms as indicators of
pollution in drinking water.
J. Am. Water Works Assoc. 52, 1577-1579.
- KAUFFMANN, F. (1966):
The bacteriology of Enterobacteriaceae.
Munksgaard, Kopenhagen.
- KLEEGERGER, A., R. BRAATZ und M. BUSSE (1980):
Zur Taxonomie und Ökologie der Enterobakterien in Milch.
Milchwissenschaft 35, 457-460.
- KLEIN, H. und D.Y.C. FUNG (1976):
Identification and quantification of fecal coliforms using
violet red bile agar at elevated temperature.
J. Milk Food Technol. 39, 768-770.
- KLEIN, D., J.A. SPINDLER und J.M. MATSEN (1975):
Relationship of indole production and antibiotic
susceptibility in the *Klebsiella bacillus*.
J. Clin. Microbiol. 2, 425-429.
- KORTH, H., I. ORSKOV und G. PULVERER (1969):
Farbstoffbildende *Klebsiella*-Stämme.
Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. 211, 105-107.
- LAUTROP, H. (1956):
Gelatin-liquefying *Klebsiella* strains (*Bacterium oxytocolum*
Flügge).
Acta Pathol. Microbiol. Scand. 39, 375-384.

LÜCK, H. und M DUNKELD (1981):
Enterobacteriaceae in cheese.
S. Afr. J. Dairy Technol. 13, 9-14.

MACÉ (1888):
L analyse bactériologique de l eau.
Annales d hygiène publique 6, 501-528.

MACKENZIE, E.F.W., E.W. TAYLOR und W.E. GILBERT (1948):
Recent experiences in the rapid identification of *Bacterium coli* type I.
J. Gen. Microbiol. 2, 197-204.

MARIER, R., J.G.WELLS, R.C.SWANSON, W.CALLAHAN und I.J.MEHLMAN (1973):
An outbreak of enteropathogenic *Escherichia coli* foodborne disease traced to imported French cheese.
Lancet 2, 1376-1378.

MARTIN, W.J., R.J. BIRK, P.K.W. YU und J.A. WASHINGTON II (1970): Identification of members of the family Enterobacteriaceae by the R/B system.
Appl. Microbiol. 20, 880-883.

MARTIN, W.J., P.K.W. YU und J.A. WASHINGTON II (1971):
Epidemiologic significance of *Klebsiella pneumoniae*. A 3-month study.
Mayo Clinic Proceedings 46, 785-793.

MATSEN, J.M. und J.C. SHERRIS (1969):
Comparative study of the efficiency of seven paper-reagent strips and conventional biochemical tests in identifying Gram-negative organisms.
Appl. Microbiol. 18, 452-457.

MATSEN, J.M., J.A. SPINDLER und R.O. BLOSSER (1974):

Characterization of Klebsiella isolates from natural receiving waters and comparison with human isolates.

Appl. Microbiol. 28, 672-678.

McCRADY, M.H. und E.J. LANGEVIN (1932):

The coli-aerogenes determination in pasteurization control.

J. Dairy Sci. 15, 321-329.

MEHLMAN, I.J. und A. ROMERO (1982):

Enteropathogenic Escherichia coli: Methods for recovery from foods.

Food Technol. 36, 73-79.

MEHLMAN, I.J. und B.A. WENTZ (1984):

Microbial associations and interactions in food.

Fleischwirtsch. 64, 303-309.

MØLLER, V. (1954):

Distribution of amino acid decarboxylases in Enterobacteriaceae.

Acta Pathol. Microbiol. Scand. 35, 259-277.

MOSSEL, D.A.A. (1967):

Ecological principles and methodological aspects of the examination of foods and feeds for indicator microorganisms.

J. Assoc. Off. Anal. Chem. 50, 91-104.

DERSELBE (1981):

Coliform tests for cheese and other foods.

Lancet 2, 1425.

DERSELBE (1982):

Marker (index and indicator) organisms in food and drinking water. Semantics, ecology, taxonomy and enumeration.

Antonie van Leeuwenhoek 48, 609-611.

MOSSEL, D.A.A. und M.A. RATTO (1970):

Rapid detection of sublethally impaired cells of Enterobacteriaceae in dried foods.

Appl. Microbiol. 20, 273-275.

MOSSEL, D.A.A., und J.E.L. CORRY (1977):

Detection and enumeration of sublethally injured pathogenic and index bacteria in foods and water processed for safety. *alimenta-Sonderausgabe* 1977, 19-34.

MOSSEL, D.A.A., P.G.H. BIJKER und I. EELDERINK (1978):

Streptokokken der Lancefield-Gruppe D in Lebensmitteln und Trinkwasser - Ihre Bedeutung, Erfassung und Bekämpfung.

Arch. Lebensmittelhyg. 29, 121-127.

MOURGUES, R., L. VASSAL, J. AUCLAIR und G. MOLQUOT (1977):

Origine et développement des bactéries coliforms dans les fromages à pâte molle.

Lait 563-564, 131-149.

MUNDT, O.J. und B.N. RAI (1963):

Rapid detection of fecal coliform bacteria in the food processing plant.

J. Milk Food Technol. 26, 46-49.

MURRAY, J.G. (1960):

The incidence of pathogenic serotypes of *Escherichia coli* in pasteurized milk and washed bottles.

J. appl. Bact. 23, 191-194.

MUSHIN, R. und F.M. ASHBURNER (1961):

Gastrointestinal microflora of mutton birds (*puffinus tenuirostris*) in relation to "limy" disease.

J. Bact. 83, 1260-1267.

NAEMURA, L.G. und R.J. SEIDLER (1978):

Significance of low temperature growth associated with the fecal coliform response, indole production, and pectin liquefaction in *Klebsiella*.

Appl. Environ. Microbiol. 35, 392-396.

NUNEZ, W.J. und A.R. COLMER (1968):

Differentiation of *Aerobacter-Klebsiella* isolated from sugarcane.

Appl. Microbiol. 16, 1875-1878.

ØRSKOV, I. (1955):

The biochemical properties of *Klebsiella* (*Klebsiella-Aerogenes*) strains.

Acta Pathol. Microbiol. Scand. 37, 353-368.

DERSELBE (1957):

Biochemical types in the *Klebsiella* group.

Acta Pathol. Microbiol. Scand. 40, 155-162.

PAPAVASSILIOU, J. (1957):

Coli-aerogenes bacteria of pasteurized milks, with special reference to pathogenic serotypes of *Escherichia coli*.

J. appl. Bact. 20, 91-94.

DERSELBE (1958):

The rapid identification of *Escherichia coli* I by the production at 44 °C of both indole and gas from lactose.

J. appl. Bact. 21, 104-108.

PARK, H.S., E.H. MARTH und N.F. OLSON (1973):

Fate of enteropathogenic strains of *Escherichia coli* during the manufacture and ripening of Camembert cheese.

J. Milk Food Technol. 36, 543-546.

PARR, L.W. (1936):

Sanitary significance of the succession of coli-aerogenes organisms in fresh and in stored feces.

Am. J. Pub. Hlth. 26, 39-45.

PATTERSON, J.E. und M.J. WOODBURN (1980):

Klebsiella and other bacteria on alfalfa and bean sprouts at the retail level.

J. Food Sci. 45, 492-495.

PREAC-MURSIC, V. und H. METZ (1974):

Zur biochemischen Differentialdiagnostik der Klebsiella-Gruppe.

Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A 226, 63-69.

PUPPEL, H. und R. BAIER (1977):

Häufigkeit und Hemmstoffempfindlichkeit von "Klebsiella oxytoca" in menschlichem Untersuchungsmaterial.

Med. Klin. 72, 809-812.

RAJ, H. und J. LISTON (1960):

Detection and enumeration of fecal indicator organisms in frozen sea foods. I. Escherichia coli.

Appl. Microbiol. 9, 171-174.

RAY, B. (1979):

Methods to detect stressed microorganisms.

J. Food Prot. 42, 346-355.

RAYMAN, M.K., G.A. JARVIS, C.M. DAVIDSON, S. LONG, J.M. ALLEN, T. TONG, P. DODSWORTH, S. McLAUGHLIN, S. GREENBERG, B.G. SHAW, H.J. BECKERS, S. QVIST, P.M. NOTTINGHAM und B.J. STEWART (1979):

ICMSF methods studies. XIII. An international comparative study of the MPN procedure and the Anderson-Baird-Parker direct plating method for the enumeration of Escherichia coli biotype I in raw meats.

Can. J. Microbiol. 25, 1321-1327.

RENNIE, R.P. und I.B.R. DUNCAN (1974):

Combined biochemical and serological typing of clinical isolates of *Klebsiella*.

Appl. Microbiol. 28, 534-539.

REPORT (1956):

The nomenclature of coli-aerogenes bacteria. Report of the coli-aerogenes (1956) sub-committee of the society for applied bacteriology.

J. appl. Bact. 19, 108-111.

REVIS, C. (1910):

The stability of the physiological properties of coliform organisms.

Zbl. Bakt. II. Abt. 26, 161-178.

RICHARD, C. (1973):

Etude antigénique et biochimique de 500 souches de *Klebsiella*.

Ann. Biol. Clin. 31, 295-303.

RUCHOFFT, C.C., J.G. KALLAS, B. CHINN und E.W. COULTER (1931):

Coli-aerogenes differentiation in water analysis.

J. Bacteriol. 21, 407-440; 22, 125-181.

SCHARDINGER, F. (1892):

Über das Vorkommen Gährung erregender Spaltpilze im Trinkwasser und ihre Bedeutung für die hygienische Beurteilung desselben.

Wiener klin. Wschr. 5, 403-405.

Derselbe (1894):

Beitrag zur hygienischen Beurteilung des Trinkwassers.

Zbl. Bakt. 16, 853-859.

SCHÖNHERR, W. (1962):

Zur hygienischen Kontrolle von Trockenmilchpräparaten.

Monatshefte Vet. med. 17, 107-112.

SCHUBERT, R.H.W. und S.W. MANN (1968):

Zum derzeitigen Stand der Identifizierungsmöglichkeiten von *Escherichia coli* als Fäkalindikator bei der Trinkwasseruntersuchung.

Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A 208, 498-506.

SCHWAB, A.H., A. SWARTZENTRUBER, B.A. WENTZ und R.B. READ Jr. (1982):

Microbiological quality of dry-milk mixes and milk substitute infant formulas.

Appl. Environ. Microbiol. 43, 389-391.

SEELEMANN, M. und K.-H. WEGENER (1956):

Zum Nachweis von *Escherichia*-*Aerobacter*-Keimen in Milchproben. Stellungnahme zur Auslegung des Begriffes "coliforme Bakterien".

Milchwissenschaft 11, 51-61.

SEIDLER, R.J., M.D. KNITTEL und C. BROWN (1975):

Potential pathogens in the environment: cultural reactions and nucleic acid studies on *Klebsiella pneumoniae* from clinical and environmental sources.

Appl. Microbiol. 29, 819-825.

SELENKA, F. (1967):

Hygienisch-bakteriologische Grundlagen des in der Lebensmittelgesetzgebung angewandten Fäkalindikatorgedankens.

Arch. Hyg. 150, 635-660.

SHARPE, A.N., P.I. PETERKIN und M.K. RAYMAN (1981):

Detection of *Escherichia coli* in foods: indole staining methods for cellulosic and polysulfone membrane filters.

Appl. Environ. Microbiol. 41, 1310-1315.

SHARPE, A.N., M.K. RAYMAN, D.M. BURGNER, D. CONLEY, A. LOIT, M. MILLING, P.I. PETERKIN, U. PURVIS und S. MALCOLM (1983): Collaborative study of the MPN, Anderson-Baird-Parker direct plating, and hydrophobic grid-membrane filter methods for the enumeration of *Escherichia coli* biotype I in foods. Can. J. Microbiol. 29, 1247-1252.

SONNENMOSER, H. und W. KESSLER (1984): Technische Möglichkeiten zur Kontrolle der Coliformen-Flora. Dtsch. Molk.-Ztg. 38, 1231-1257.

STENZEL, W., H. BÜRGER und W. MANNHEIM (1972): Zur Systematik und Differentialdiagnostik der *Klebsiella*-Gruppe mit besonderer Berücksichtigung der sogenannten Oxytocum-Typen. Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. A 219, 193-203.

STILES, M.E. und L.-K. NG (1981a): Biochemical characteristics and identification of Enterobacteriaceae isolated from meats. Appl. Environ. Microbiol. 41, 639-645.

DIESELBEN (1981b): Enterobacteriaceae associated with meats and meat handling. Appl. Environ. Microbiol. 41, 869-872.

TAYLOR, S.L., L.S. GUTHERTZ, M. LEATHERWOOD und E.R. LIEBER (1979): Histamine production by *Klebsiella pneumoniae* and an incident of scombroid fish poisoning. Appl. Environ. Microbiol. 37, 274-278.

TESONE, S. und F. QUEVEDO (1978): Contrôle microbiologique du fromage. I. Fromage à pâte molle: "Le Cuartirolo". Le Lait 58, 43-56.

TESONE, S., B.E. MARTINEZ und F. QUEVEDO (1981):
Contrôle microbiologique du fromage. II: Fromage à pâte
demi-dure: " Le Pategras" (Gouda argentin).
Le Lait 61, 19-30.

THOMAS, S.B. (1955):
Coli-aerogenes bacteria in raw milk.
J. appl. Bact. 18, 331-357.

THOMAS, S.B., L.F.L. CLEGG, W.A. CUTHBERT, C.D. OXLEY, C.A.
SCARLETT und C.H. WESTWATER (1955):
Studies of the determination of the Bacterium coli type I
content of farm water supplies.
J. appl. Bact. 18, 9-16.

TOLLE, A., I. OTTE, G. SUHREN und W. HEESCHEN (1980):
Zur Mikroflora von Camembert.
Milchwissenschaft 35, 21-25.

TOLLE, A., I. OTTE und G. SUHREN (1981):
Zur Dynamik der produktspezifischen Keimflora und von coli-
formen Keimen/E. coli während des Herstellungsprozesses von
Camembertkäse.
Milchwissenschaft 36, 5-9.

TRAUB, W.H., E.A. RAYMOND und J. LINEHAN (1970):
Identification of Enterobacteriaceae in the clinical
microbiology laboratory.
Appl. Microbiol. 20, 303-308.

VRACKO, R. und J.C. SHERRIS (1963):
Indole-spot test in bacteriology.
Am. J. Clin. Pathol. 39, 429-432.

WEBER, A., U. NEUMEIER und T. SCHLIESSER (1975):

Untersuchungen über das biochemische Verhalten und die Antibiotikaempfindlichkeit von Keimen der Gattung Klebsiella, isoliert aus Untersuchungsmaterial von Pferden.

Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 88, 121-123.

WEISS, N. und M. BUSSE (1968):

Die Bedeutung und Zuverlässigkeit des Colititers.

Dtsch. Mol.-Ztg. 89, 1299-1303.

WOLFE, M.W. und D. AMSTERDAM (1968):

New diagnostic system for the identification of lactose-fermenting gram-negative rods.

Appl. Microbiol. 16, 1528-1531.

ZABRANSKY, R.J., J.W. HALL, F.E. DAY und G.M. NEEDHAM (1969):

Klebsiella, Enterobacter, and Serratia: biochemical differentiation and susceptibility to ampicillin and three cephalosporin derivatives.

Appl. Microbiol. 18, 198-203.

Abschließend möchte ich Herrn Prof. Dr. G. Terplan für die Überlassung des Themas danken.

Weiterhin danke ich Herrn Dr. H. Becker für seine Hilfe und Beratung.

Für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung danke ich Herrn Prof Dr. Dr. K. Osterkorn.

Der Fa. OXOID - Wesel danke ich für die kostenlos zur Verfügung gestellten Nuflow-Membranen.

Herrn Dr. W. Mellert danke ich recht herzlich für seine Hilfe beim Schreiben der Arbeit.

Lebenslauf

Am 25. Juni 1957 wurde ich, Wolfgang Lilienthal, als Sohn des Oberstudienrates Günter Lilienthal und seiner Frau Christine, geb. Waschitzki, in Neuburg/Donau geboren.

Nach Besuch der Volksschule in Neuburg/Donau bestand ich am Descartes-Gymnasium in Neuburg/Donau im Juni 1976 die Reifeprüfung.

Nach Ableisten des Grundwehrdienstes von Juli 1976 bis September 1977 begann ich im Wintersemester 1977 das Studium der Tiermedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität in München, das ich im Dezember 1982 mit dem Staatsexamen beendete. Im Januar 1985 erhielt ich die Approbation als Tierarzt.

